FACULTÉ MIXTE
DE
MEDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

No. 2

# CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'UTILISATION DES HYDRATES D'AMMONIUM QUATERNAIRES EN OENOLOGIE

## Evaluation de leur Pouvoir Fongostatique et Fongicide

# THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

Le Mercredi 16 Février 1955

PAR

Leila KOEBE, née FARID AMIN

Née le 21 Août 1930 à ABOU - KEBIR (Egypte)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

| | | |
|---|---|---|
| Examinateurs de la Thèse | PELLISSIER | Président |
| | BALANSARD | |
| | DUMAZERT | Assesseurs |
| | GREBUS | |

[1955]

FACULTÉ MIXTE
DE
MEDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

No. 2

# CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'UTILISATION DES HYDRATES D'AMMONIUM QUATERNAIRES EN OENOLOGIE

## Evaluation de leur Pouvoir Fongostatique et Fongicide

# THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

Le Mercredi 16 Février 1955

PAR

Leila KOEBE, née FARID AMIN

Née le 21 Août 1930 à ABOU - KEBIR (Egypte)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

| | | |
|---|---|---|
| Examinateurs de la Thèse | PELLISSIER | Président |
| | BALANSARD | |
| | DUMAZERT | Assesseurs |
| | GREBUS | |

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

# CONTRIBUTION
# A L'ETUDE DE L'UTILISATION
# DES HYDRATES D'AMMONIUM QUATERNAIRES
# EN OENOLOGIE

---

## EVALUATION DE LEUR POUVOIR FONGOSTATIQUE
## ET FONGICIDE

DOYEN : G. MORIN — Assesseur : J. DELPHAUT

Doyen Honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MM. AUBARET, AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, HECKENROTH, JOYEUX, OLMER, RIMATTEI, ROCHE, ROGER

Chargé de cours honoraire : M. TIAN

Secrétaire Principal : J. COMTE — Bibliothécaire : Mlle PERRIN

## PROFESSEURS

| | |
|---|---|
| Anatomie | GRISOLI |
| Anatomie Pathologique | GASTAUT |
| Bactériologie et Pathologie Générale | BRAHIC |
| Botanique et Cryptogamie | PELLISSIER |
| Cardiologie clinique et expérimentale | JOUVE |
| Chimie Médicale | DERRIEN |
| Chimie Analytique et Hydrologie | ARNOUX |
| Chimie | DUMAZERT |
| Clinique Chirurgicale | FIOLLE |
| Clinique Chirurgicale | MOIROUD |
| Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique | SALMON |
| Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie Expérimentale | de VERNEJOUL |
| Clinique Dermato-Syphiligraphique | CHARPY |
| Clinique Exotique | BLANC |
| Clinique des Maladies du Système Nerveux | POURSINES |
| Clinique Médicale | MATTEI |
| Clinique Médicale | POINSO |
| Clinique Médicale Thérapeutique | OLMER J. |
| Clinique des Maladies des voies digestives et de la nutrition | N..... |
| Clinique Médicale Infantile | GIRAUD |
| Clinique Neuro-Chirurgicale | PAILLAS |
| Clinique Obstétricale et Gynécologique | CHOSSON |
| Clinique Ophtalmologique | JAYLE |
| Clinique Urologique | CHAUVIN |
| Histologie | PICARD |
| Hygiène et Médecine Préventive | SAUTET |
| Matière Médicale | BALANSARD |
| Médecine Légale et Médecine du travail | MOSINGER |
| Parasitologie | RANQUE |
| Pathologie Chirurgicale | CARCASSONNE |
| Pathologie Interne | AUDIER |
| Pharmacologie | MERCIER |
| Pharmacie chimique et Toxicologie | VIGNOLI |
| Pharmacie Galénique | DELPHAUT |
| Physiologie | MORIN |
| Physique Médicale | DUBOULOZ |
| Thérapeutique | PIERI |
| Professeur sans chaire | ROUX. |

## MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

M.M. BOURRET
DONNET
GREBUS

M.M. MERCIER Jacques
MOURGUE
LISSITZKY

## AGRÉGÉS EN EXERCICE

M.M. APPAIX
BERNARD
CREMIEUX
GRANJON
HENRY
LAMY
LAVAL
LENA

MM. MARONNEAUD
MONGES H.
OLLIVIER
OURGAUD
PAOLI
RAYBAUD
SERMENT
VAGUE

## AGRÉGÉS LIBRES

MM. BERTHIER
DOR
FIGARELLA

MM. IMBERT
RECORDIER

### Chargés des fonctions de maîtres de conférences

| | |
|---|---|
| Anatomie pathologique | M. PAYAN |
| Botanique et Cryptogamie | M. BERNARD P. |
| Histologie | M. STAHL |

### Chargé des fonctions d'agrégé

| | |
|---|---|
| Clinique Urologique | M. CHAUVIN F. |

A MA GRAND - MÈRE,

A MES PARENTS,

*Faible témoignage de ma profonde affection et de ma sincère gratitude.*

*Je garde de mes années d'étude un souvenir magnifique.*

A MON MARI,

A MON FRÈRE.

A MON MAITRE,

Monsieur le Professeur PELLISSIER,

*Avec ma respectueuse*
*sympathie et ma grande*
*reconnaissance,*

# AVANT-PROPOS

C'est avec joie et reconnaissance envers nos maîtres que nous présentons aujourd'hui cette thèse de Phytopharmacie, elle représente pour nous le meilleur souvenir de nos années d'étude passées si agréablement à Marseille.

Nous aimerions qu'elle soit la preuve de notre attachement à cette Faculté, de notre reconnaissance envers nos maîtres dont nous avons apprécié l'enseignement dévoué. Nous voudrions aussi qu'elle parle un peu de la France ce si beau pays, et que, plus tard, lorsque nous la relirons, elle nous fasse revivre des moments si beaux passés dans cette Faculté et tout particulièrement dans ce pavillon de botanique où nous étions si affairés autour de nos boites de Petri, nos cuves à fermentation.

Enfin, nous voudrions que cette thèse soit comme un signe d'amitié entre l'Egypte et la France, ces deux pays où sont nées de si grandes et belles civilisations, nous-même étant Egyptienne par notre père et Française par notre mère, nous aimerions qu'elle apporte dans notre pays un peu de l'esprit français, de son originalité.

Avant tout autre notre reconnaissance s'adresse à Mr. le professeur PELLISSIER, qui, nous intéressant au Certificat de Phytopharmacie fit naitre en nous l'idée d'un travail de thèse. Son grand intérêt pour la phytopharmacie, son ardeur communicative nous incita à la recherche d'un sujet intéressant et d'actualité.

Plusieurs de nos conférenciers dans le cadre du Certificat de Phytopharmacie nous avaient présenté les nouveaux produits antiparasitaires : fongicides, insecticides, et herbicides ; et nous avions été quelque peu impressionnés d'apprendre l'usage que dans le pays de BRILLAT - SAVARIN on tendait à faire de ces substances en vue d'obtenir un meilleur rendement des cultures. Tel est le cas entre autre de ces hydrates d'ammonium quaternaires dont on parle tant aujourd'hui et que notre formation de pharmacienne croyait destinés exclusivement à la stérilisation des instruments de chirurgie "Cold sterilization" des instruments chirurgicaux ( LEWISON E.F. ) ; ou à l'usage externe, et que nous avons eu la surprise de voir appliquer dans le domaine de l'industrie alimentaire ( 2 ) ( 16 ) et plus spécialement dans les industries de fermentations: brasseries, oenologie, par exemple, le traitement des bouteilles avant remplissage par une solution de bromure de dodecyl - dimethyl - ammonium (Urquhart) (51).

Notre conférencier, œenologue distingué nous faisait part de son inquiétude devant des pratiques naissantes dont il devinait toutes les fâcheuses incidences et qui consistaient à utiliser ces hydrates d'ammonium quaternaires dans la désinfection des cuves à fermentation ; là, disait-il n'est point le mal, pourvu qu'un rinçage rigoureux élimine la totalité du produit car, s'il ne discutait pas le pouvoir antiseptique de ces composés, il redoutait les incidences inévitables sur la fermentation dues à un rinçage insuffisant.

Par la suite dans cette Faculté à laquelle nous devons tant, ce problème a été plusieurs fois évoqué devant nous par d'autres maitres, qui nous apprenaient les propriétés tensio-actives curarisantes et toxiques de ces substances. Tout celà contribua à nous faire ressortir l'importance de ces corps de la chimie organique, toute leur originalité et leur importance croissante dans l'industrie ; nous avons alors voulu avant de quitter

Marseille faire un travail devant constituer une thèse de pharmacie dont nous fixerons plus loin l'objet précis ; pour celà, nous avons demandé à notre maitre le professeur PELLISSIER de nous guider ; combien avons-nous été impressionnés de voir que lui-même s'intéressait à cette question, cependant, il nous disait aussitôt qu'un tel travail sur l'action des hydrates d'ammonium quaternaires en œnologie ne pouvait être réalisé sous sa seule direction mais devait mettre à contribution d'autres disciplines d'ailleurs incluses elles-mêmes dans le cadre de l'Institut de Phytopharmacie.

Au terme de 18 mois de travail il nous est une émotion très agréable avant d'aborder le sujet d'exprimer notre gratitude sincère à Monsieur le professeur PELLISSIER, notre Maitre, pour sa patience inlassable, ses directives éclairées ; notre plus grande joie est de le voir présider à la soutenance de notre thèse

Nous sommes touchés de la sincère et confiante sympathie que Mr. le professeur BALANSARD a toujours su nous témoigner et de la pertinence de ses observations en matière d'oenologie.

Notre vive reconnaissance va à Mr. le professeur DUMAZERT pour le bienveillant accueil qu'il nous a toujours fait dans son laboratoire, nous lui devons la possibilité d'avoir pu procéder à de nombreuses analyses ; elle va également à Mr. le professeur GREBUS qui a bien voulu juger ce travail, nous savons tout l'intérêt que dans le domaine de l'industrie laitière il a apporté à l'étude des hydrates d'ammonium quaternaires.

Nous remercions également Mr. le professeur ARNOUX pour ses conseils éclairés et nous tenons à lui exprimer, ici, le témoignage de gratitude d'une élève qui, sur le point de quitter la Faculté, a eu l'inestimable privilège de bénéficier à la fois de son enseignement et de ses conseils.

Dans l'expression de notre gratitude nous tenons à nous adresser particulièrement à Mr. le Dr. BERNARD pharmacien des hôpitaux, maitre de conférences délégué pour ses conseils pratiques et pour l'intérêt avec lequel il a suivi nos travaux.

Notre gratitude va également à Mr. le Dr. PASTOR, Chef de travaux pratiques de chimie analytique, d'avoir mis si gentiment à notre disposition les appareils dont nous avions besoin pour certaines de nos analyses.

Nous n'aurons garde enfin d'oublier nos amis, assistants et préparateurs du Laboratoire de botanique que nous avons toujours trouvé inlassablement dévoués ; parmi eux qu'il nous soit permis de citer Mr. BARZILOY assistant, Mr. SIBOURG assistant et Mr. BALM agent technique que nous tenons à remercier d'une manière toute particulière pour son aide dévouée.

# OBJET DE NOTRE TRAVAIL

Nous savons que depuis longtemps le problème de la désinfection est hanté par le souci de trouver un produit pratique actif et non toxique, en particulier pour certains usages, tel est celui de la désinfection de cuves de vinification. Cette recherche incessante a conduit à l'utilisation de ces ammoniums quaternaires dont le grand succès est dû à leurs propriétés très favorables à cette désinfection. En effet, leur pouvoir tensioactif, leur pouvoir détergent ou aphrogène permettent une bonne imprégnation des objets à désinfecter.

## PRINCIPE DE LA DÉSINFECTION DES CUVES.

Les principales raisons qui ont incité les oenologues à utiliser des produits antiseptiques susceptibles d'assurer la désinfection des cuves se rangent sous deux étiquettes =

a/— le souci d'éliminer les colibacilles (gram—)et tous les agents gram + en général ( celà fait partie du pouvoir bactéricide du produit ) ;

b/— le souci de détruire, d'une part les champignons saprophytes ( moisissures vertes ou blanches ) susceptibles de polluer le moût, et d'autre part, les espèces " pathogènes" (1) qui sont à l'origine de nombreuses maladies du vin comme la Casse, le fleurissement, la tourne, la mannite et l'acétification (que nous étudions plus particulièrement ici.)

Cette action sur les champignons suppose une activité fongicide pour le produit utilisé.

---

(1)— Précisons que le vocable s'entend ici pour le vin.

Le pouvoir bactéricide fut étudié et prouvé par de nombreux travaux, citons entre autre ceux de BENIGNO et BERTI (6) (7) (8), ceux de BUTTERFIELD C.T., WATTIE E. et CHAMBERS C.W. (12) (13), ceux de DAMIENS (19), ceux de GROSSI C. (25), ceux de SMITH C. B., NISHIHORA H., COLDEN F., HOYT H., GUSS C. O. KLOETZEL M. C. de l'école de Los Angelès (46). Nous rappelons que la première fabrication de ces "savons invertis", (C'est ainsi que parfois l'on appelle ces détersifs cationiques) fut réalisée en 1935 par DOMACK et que lui-même leur avait reconnu des propriétés antibactériennes.

La désinfection des cuves est donc opérée à l'aide de badigeonnages ou de pulvérisations d'hydrates d'ammonium quaternaires suivis d'un rinçage. Cette dernière opération si elle est négligée ou plus ou moins bien faite, risque d'introduire le produit dans le circuit de la vinification et en dernier stade dans le vin lui-même qu'il est supposé protèger de l'atteinte de ses principales maladies. (ces substances joueraient en fait le rôle de stabilisateur vis-à-vis du vin).

Quelles sont les incidences de ce modus operandi sur la fermentation vinaire, c'est-à-dire sur les levures du vin, sur la conservation du moût, sur la prévention contre les maladies du vin (particulièrement l'acétification par Mycoderma aceti) tel est l'objet de notre travail.

Nous essayerons d'établir une relation entre l'action du produit sur ces levures et sur les champignons filamenteux saprophytes susceptibles d'envahir le moût; en d'autres termes c'est l'action fongicide ou fongostatique du produit qui retiendra notre attention. En effet, nous tenons à faire remarquer que jusqu'ici les préoccupations se portaient plutôt vers le côté bactéricide de l'action antiseptique générale de ces détersifs cationiques que sont les hydrates d'ammonium quaternaires. Tout récem-

ment encore KLARMANN E. G., et WRIGHT E. S. (30) se posaient cette question que nous nous posons nous-même et à laquelle nous essayons de répondre : les composés d'ammonium quaternaires sont-ils fongicides ?

Enfin une question reste à poser, le moût et le vin traités par ces produits à des doses "antiseptiques" sont-ils toxiques ?

# PLAN ADOPTÉ

Ayant précèdemment établi l'objet de nos recherches, nous tenons maintenant à donner une idée du plan que nous proposons.

Notre travail se divisera en 2 parties.

Avant d'aborder l'objet de nos recherches, il nous est apparu indispensable de donner dans un chapitre préliminaire des notions générales sur les hydrates d'ammonium quaternaires, nous donnerons également quelques définitions des termes que nous sommes amenés à utiliser couramment dans notre exposé, nous donnerons aussi une énumération des divers produits utilisés. Nous caractériserons ces ammoniums quaternaires en rappelant leurs principales propriétés, lesquelles varient souvent avec leur formule chimique. Nous ferons un bref rappel de leur action pharmacodynamique, de leur toxicité. Enfin nous terminerons ces notions préliminaires par un exposé des principales méthodes de dosage ou méthodes d'évaluation du pouvoir fongicide et antiseptique général de ces substances tensio-actives.

Notre seconde partie est consacrée à nos recherches personnelles. En effet, ici nous abordons les recherches concernant l'activité des hydrates d'ammonium quaternaires sur la fermentation vinaire, sur les champignons saprophytes susceptibles de polluer le moût en fermentation (moisissures vertes ou blanches) et sur les maladies du vin (acétification en particulier)

Dans un premier chapitre nous exposerons nos essais et expériences faits sur la fermentation, (d'abord celle du moût de bière, puis celle du moût de raisin).

Dans un second chapitre, nous exposerons les résultats de notre étude sur l'action de ces substances sur l'acétification.

Dans un troisième chapitre nous expliquerons nos essais de toxicité faits sur des cobayes.

Enfin, nous exposerons nos conclusions générales.

# PREMIÈRE PARTIE

## A – CHAPITRE PRÉLIMINAIRE

Les ammoniums quaternaires dont le désogène fait partie, sont des produits qui dérivent en général d'halogénure d'ammonium (chlorure ou bromure) dans lesquels les quatre atomes d'hydrogène du groupement ammonium ($NH_4$) ont été substitués par radicaux organiques.

Les ammoniums quaternaires sont donc des produits organiques riches en carbone, ce sont en général de grosses molécules, qui contiennent souvent dans leur formule des groupements ethyl ou méthyl. Ces substances sont aussi appelées "savons inversés" ce sont des détersifs cationiques par opposition aux détersifs anioniques, on peut les préparer par synthèse industrielle. Ils sont souvent utilisés dans l'industrie sous forme de chlorure ou de bromure.

Il existe une grande variété dans les formules de ces produits, c'est ce que nous essayons de montrer par l'énumération suivante.

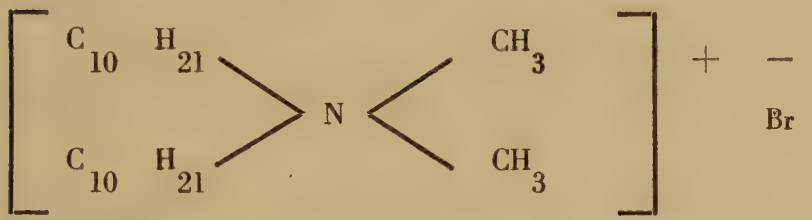
### 1o/- PRINCIPAUX AMMONIUMS QUATERNAIRES UTILISÉS

— Ammonium quaternaire à chaine longue unique

— Ammonium quaternaire à 2 chaines lypophiles, caractérisés par la présence dans le cation d'une longue chaine dont parle RESUGGAN. S. Cl. (41)

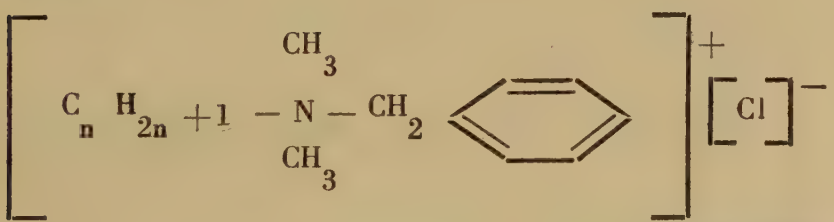
— Ceux à 2 chaines hydrophobes et ceux à chaines jumelles dont parle encore RESUGGAN S.Ci. (41). Le Deciquam

présenté par the "British Hydrological corporation" fait partie de ce dernier type, c'est le bromure de didecyl-dimethyl ammonium de formule :



— Ammoniums quaternaires possédant un radical alkyl dans leur formule.

Ce radical alkyl est un radical hydrocarboné acyclique à longue chaine. Dans ce groupe nous citons :
Le Cequartyl ou chlorure d'alkyl dimethyl-benzyl-ammonium de formule =



cation lypophile — anion hydrophile

L'amosepta ou chlorure d'alkyl dimethyl-benzyl-ammonium
Le B T C ou chlorure d'alkyl dimethyl-benzyl-ammonium
Le C T A B ou bromure d'alkyl trimethyl-ammonium

— Ammonium quaternaire 2 fois ammonium quaternaire de DAMIENS (19) tels sont ceux préparés à partir des acides suberique, sebacique et azelaique dont parlent SIANEK (S) et LETOVSKY V. (48). Ces produits sont alors du type bromure de polyméthylène bis diméthyl-benzyl-ammonium ou zephyrol.

— Ammoniums quaternaires du type Cetavlon ou bromure de ce dimethyl ammonium servant de base aux experimentations de Saltson (M.R.S.) (42).

— Ammoniums quaternaires du type Gernibac ou Bacfor ou bromure de lauryl - dimethyl - benzyl - ammonium.

— Ammoniums quaternaires dérivés de pyridine et piperidines substituées préparés par HARRIS G.H. et SHELTON R.S. (26).

— Ammoniums quaternaires à chaines aliphatiques ramifiées.

— Désogène ou méthly - phenly dodecyl trimethyl ammonium et qui est à la base de notre expérimentation.

## 2o/- PROPRIETES DES AMMONIUMS QUATERNAIRES

Les ammoniums quaternaires ont été étudiés surtout en tant que bactéricides, leur étude en tant que fongicide passe plus au second plan.

*Au point de vue de leur pouvoir bactéricide* de nombreuses expériences ont montré qu'une *température élevée* favorisait leur action, de même la nature de l'eau servant à faire la dilution interviendrait, telles sont les observations faites par BUTTERFIELD, WATTIE et CHAMBERS (12-13); le rôle du pH fut surtout étudié par SOIKE, MILLER et ELLIKER (47). *Certaines substances* ont une *action antagoniste* de celle des ammoniums quaternaires, ce sont, le savon suivant les expériences de BUTTERFIELD, WATTIE et CHAMBERS, la lecithine d'après BENIGNO et BERTI (6). " L'action antagoniste de l'histidine est nettement mise en évidence dans des expériences faites sur le disulfure de tetramethyl thiuram (T.M.T.D.), cette action antitoxique fut expérimentée sur le Botrytis Cinerea, Penicillium Italicum, Aspergillus niger et Rhizopus nigricans, le pH élevé de la solution favoriserait cette action, laquelle se

traduit par une inhibition de la germination des spores", telles sont les conclusions des travaux de SIJPESTEIJN et VAN der KERK (45). Ce travail nous parait assez difficile à interpréter. Cet effet serait de caractère compétitif. Enfin le rouge congo agit comme antagoniste par neutralisation des résidus quaternaires supprimant ainsi leur action ultérieure sur les bactéries (COLLINS - JOHONSSON - (15).

Parmi les substances ayant des effets potentialisateurs sur ces détersifs, citons le chlorure de cobalt, action particulièrement étudiée sur le C. T. A. B. par GERSHENFIELD et STEDMANN de Philadelphie (23).

*L'action sporicide* des ammoniums quaternaires est supposée à des concentrations allant jusqu' à 1 % ces sels sont inactifs sur les micro - organismes anaerobies sporulant comme le Clostridium Welchii, C. Tetani, C. sporagenes et Bacillus anthrácis (Ce dernier aerobie). Les expériences furent faites par KLARMANN et WRIGHT (29); d'autres essais faits par GURRANN et EVANS (18) ont montré que même dans les conditions optima (en particulier température de 80° et 95° C et à divers pH) ces composés ne tuent pas toutes les spores de tous les échantillons.

L'action des ammoniums quaternaires sur les bacilles et en particulier l'étude faite par l'école de Los Angelès (46) sur le *bacille de Koch,* montre une faible activité de ces substances sur ces corps.

*En ce qui concerne l'action fongicide* des travaux faits par MASON, BROWN et MINGA (36) sur le rapport existant entre la constitution chimique et l'action fongicide, ont prouvé que ce sont les fongicides possédant un groupement ammonium quaternaire qui seraient les plus actifs, l'un des plus intéressants parmi ceux - ci est le chorure de dimethyl - lauryl - ammonium connu sous le nom d'Isothan D. L.

Cela n'est cependant pas absolument établi puisque très récemment KLARMANN et WRIGHT se posaient encore : "Are quats fungicides?" (30).

*Au point de vue de leurs propriétés physiques,* les ammoniums quaternaires sont des substances *tensio-actives* et l'on pense que c'est cette propriété qui interviendrait en permettant la fixation du produit sur le corps bactérien et en l'isolant du milieu ambiant (7). Enfin les ammoniums quaternaires sont solubles dans l'eau et l'alcool.

## 3o/- L'ACTIVITE FONGICIDE DES AMMONIUMS QUATERNAIRES-SES RAPPORTS AVEC LA FORMULE CHIMIQUE

### Définition

Il serait d'abord utile de définir clairement les termes que nous sommes appelés à employer au cours de cet exposé. C'est ainsi que :

— *par fongicide,* on entend des substances destinées à provoquer une mortalité ou l'arrêt du développement d'un champignon parasite (1). Ces produits peuvent s'adresser soit aux champignons parasites des végétaux, soit à ceux parasites de l'espèce animale.

— *par fongostatique* on entend une substance capable d'inhiber la formation et la maturation des spores ou conidies qui assurent la dissemination de l'espèce ; la colonie de champignons devient alors stérile, elle est incapable de reconstituer les diverses étapes du cycle vital, le processus de multiplication asexuée est inhibé. Une autre définition des fongostatiques tend à se baser sur l'inhibition du développement mycelien, au lieu de l'arrêt de formation de spores.

---

(1) — Cette définition est donnée par le lexique de Phytopharmacie édité par la Société Française de Phytiatrie et de Phytopharmacie.

Quelles sont donc les relations qui existent entre l'activité fongicide de ces substances (les ammoniums quaternaires) et leur formule chimique; énumérons ces relations.

— L'activité des ammoniums quaternaires est moindre avec la double chaîne qu'avec une chaîne simple à même nombre d'atomes de carbone.

Les composés à chaînes jumelles sont plus solubles que ceux à chaîne simple à même nombre d'atomes de carbone. Ces particularités ont été mises en évidence par RESUGGAN (41).

— D'après MASON, BROWN, MINGA (36), parmi les fongicides renfermant un ammonium quaternaire, la substitution en para est en général plus efficace que celle en ortho ou en meta.

— D'après ZISSMANN (53) les propriétés de certains sels d'ammoniums quaternaires dépendent des variations conjuguées de certains radicaux et du groupement polaire compris dans leur formule. L'activité de ces sels serait en liaison avec la structure générale de la molécule, tous les substituants sur l'azote sont interdépendants les uns des autres. Par variation du groupement polaire on fait varier le pouvoir antiseptique, ce groupement polaire semble parfois exalter l'action désinfectante.

— Dans le groupe des sels d'ammonium quaternaires dérivés de pyridines substituées préparés par HARRIS - SHELTON VAN CAMPEN (26) le maximum d'activité est atteint quand la somme des atomes de C des groupements C alcoylés et N alcoylés est comprise entre 16 et 19. A l'intérieur de cette zone, l'activité dépend moins de la ramification de l'isomérie de position ou de la nature de l'anion.

## 4°/- ACTION PHARMACODYNAMIQUE ET TOXICITE DES AMMONIUMS QUATERNAIRES

Mise à part leur propriété curarisante que possède une classe spéciale d'ammoniums quaternaires utilisés en thérapeutique, en particulier en chirurgie, les ammoniums quaternaires utilisés comme antiseptiques possèdent une certaine toxicité rendant leur emploi assez dangereux dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent alors suivant STEWART (49) donner des effets toxiques simulant une avitaminose.

Des cas d'empoisonnements mortels ont été notés, ces intoxications seraient dues à une inhibition de la cholinestérase et des enzymes d'oxydation intra - cellulaire. Les recherches expérimentales faites par ADELSON (1) sur des rats albinos montrent que *ces actions seraient renforcées par l'alcool.*

Une mort subite par ingestion de solution de bromure de tétra - ethyl - ammonium (T. E. A. B.) a été observée par le Dr. SCHWARTZ de Copenhague (43), cela sans doute par hypotension forte et subite.

L'étude de l'intoxication aiguë et chronique par l'ion tetra - éthyl - ammonium a montré que la mort était due à l'arrêt du centre respiratoire (28).

Enfin, consécutivement à leur utilisation en antiseptie externe, des éruptions cutanées ont été notées par CRUICKSHANK et SQUIRE de Birmingham (17), parfois celles - ci s'accompagnent d'éosinophilie.

## 5°/- METHODES D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTISEPTIQUE DES AMMONIUMS QUATERNAIRES

Les ammoniums quaternaires sont des détersifs cationiques de propriétés antiseptiques générales ; cette action désinfectante présente deux possibilités, d'une part, une activité bactéricide et d'autre part un pouvoir fongicide et fongostatique.

L'évaluation de l'activité antifongique est beaucoup plus délicate à établir que celle de l'activité bactéricide, en effet, si cette dernière propriété est classée grâce à de nombreux travaux dont ceux de KLARMANN (31) et Mac CULLOCH (35), il n'en est pas de même pour le pouvoir fongicide (30).

Les méthodes d'évaluation dont nous allons donner un aperçu dans la suite de notre exposé sont de deux catégories, les unes mettent en évidence le pouvoir antiseptique général des ammoniums quaternaires, les autres s'adressent plus particulièrement au pouvoir antifongique de ces substances.

1./- Techniques d'évaluation du pouvoir antiseptique des ammoniums quaternaires.

— Technique de P. BENIGNO et T. BERTI (7).

Cette méthode consiste en la détermination de la quantité minimum nécessaire pour tuer un nombre de bactéries donné ; dans le cas présent, ces expériences sont faites sur le C.T.A.B. ou bromure d'alkyl triméthyl ammonium.

— Technique de C. T. BUTTERFIELD, E. WATTIE et C. W. CHAMBERS (12).

Cette méthode mesure l'activité antiseptique du produit en faisant une numération des germes vivants dans une suspension d'Escherichia Coli après une minute d'exposition à l'agent antiseptique évalué. Toutefois, la mesure des quantités résiduelles du produit désinfectant en fonction de l'activité a conduit à un échec.

— Technique de D.N. EGGENBERGER, L.A. HARRIMANN, M.S. Mac CLORY, D. NOEL, H. S. HARWOOD école de Chicago (22)

Cette technique met en oeuvre des phénomènes électriques, elle se base sur la mesure de la conductibilité au cours des mécanismes bactéricides. En effet, des expériences ont montré que lorsque l'on fait agir sur Staphylococcus Aureus des agents tensio-actifs à effet bactéricide, l'étude de phénomène de conductibilité électrique permet de déceler l'activité de ces agents à des concentrations bien inférieures à celle nécessaire à la destruction complète des germes.

— Technique Phénol-coefficient + Bacto-oxgall-media (1) (2) (33)

Alors que toutes les techniques énumérées précédemment ne tiennent pas compte du phénomène de bactériostase qui intervient au cours de l'action des ammoniums quaternaires, cette méthode mise au point par KLARMAN et WRIGHT fait intervenir un neutraliseur spécifique de la bactériostase produite par les ammoniums quaternaires.

Mode opératoire

1°- Préparation du "bacto-oxgall media"

Suivant que l'on emploie d'E. Typhosa ( HOPKINS ) ou de S. aureus comme organisme test, 1 % ou 5 % de bacto-oxgall sont utilisés. La composition pour l'usage avec E. Typhosa est la suivante:

| | |
|---|---|
| — peptone | 10 gr. |
| — extrait de boeuf | 5 gr. |
| — bacto-oxgall | 10 gr. |
| — H20 distillée | 1000 cm3 |

(1) - ox = boeuf gall = bile media = transmetteur de force ou intermediaire.

(2) Technique de LAMBIN (34). Cette méthode consiste dans la mesure du "pouvoir antigénétique" sur des bactéries. Des expériences furent faites sur Staphylococcus Aureus pour les gram + et Escherichia Coli pour les gram —. C'est une méthode de mesure de l'activite antimicrobienne de substances chimiques en général.

On fait bouillir ce mélange et on ajuste à un pH de 7.4, le mélange est ensuite mis à l'autoclave pendant une demi-heure.

On ajoute ensuite 5 grammes de "Super-cel" (ou 10 grammes si le mélange contenait 5 % de bacto-oxgall). On filtre ensuite pendant que le mélange est encore chaud, puis on ajoute 5 grs de dextrose par litre. On répartit en tubes de 20 cc. et on met à l'autoclave pendant une demi-heure sous 15 atmosphères de pression.

2°- Expérience

On prélève 0,05 cm3 du bouillon de culture de 24 h. ce bouillon préparé suivant la technique F.D.A. (31), on met les 0,05 cm3 dans des tubes stériles de 25×150 mm, en évitant de toucher les parois des tubes.

Ces tubes sont ensuite mis au bain-marie à 20 °C. On prélève alors 0,5 cm3 du désinfectant à tester, lequel est dilué, et, lui-même conservé aussi au bain-marie à 20 °C, on ajoute 0,5 cm3 du désinfectant à chacun des tubes contenant déjà le bouillon de culture, on mélange soigneusement.

Dix minutes après, 20 cm 3 du bouillon Bacto-oxgall sont versés dans chacun des tubes, on doit opérer d'une façon très aseptique. On laisse incuber 48 heures à 37 °C. et on note les résultats.

Enfin, d'autres techniques utilisent soit le test de NUNGESTER et KEMPF, dit test de prévention d'infection, soit celui de SPAULDING et BONDI, appelé test de prévention de toxicité, soit des tests irritatifs sur l'oeil de l'animal tel celui de BREWER (40).

2°/- Techniques d'évaluation du pouvoir fongicide des ammoniums quaternaires.

Le pouvoir antifongique, à l'inverse du pouvoir bactéricide

des ammoniums quaternaires est assez mal établi, tout au moins au point de vue quantitatif, le reconnait KLARMANN. (30).

— A.O.A.C. "Phenol coefficient" method (30).

Cette méthode est adoptée par "the association of official agricultural chemists"

Mode opératoire

Une suspension de cultures agées de dix jours est ajustée de façon à contenir 5 millions de spores par cm3. On prélève 1/2 cm 3 de la suspension de spores et on l'ajoute à 5 cm3 du désinfectant à tester, lui-même dilué, l'opération est effectuée à 20° C.

Au bout de 10 minutes, avec une öse de 4 mm. de diamètre, 4mm. de la suspension sont retirés et mis à la surface d'un tube contenant un bouillon dextrosé et immédiatement versé dans un second tube contenant aussi du bouillon dextrosé, ce modus operandi a pour but d'éliminer le phénomène de la fongostase très fréquent dans le groupe des ammoniums quaternaires. Les tubes sont laissés incuber deux semaines à 28° C.

D'autre part, des essais d'élimination, du processus de fongostase ont été faits par adjonction de lécithine ou de sorbitan mono-oléate (Tween 80).

Conclusions et critiques de cette méthode (30)

Les critiques ont été faites par KLARMANN et WRIGHT. Le A.O.A.C. fungicidal test ne donne pas des résultats satisfaisants pour déterminer le pouvoir fongicide des ammoniums quaternaires, car il ne contrôle que très partiellement la fongostase prononcée propre à cette classe de composés, et, ce phénomène tend à obscurcir les résultats de l'action fongicide proprement dite.

— Technique éliminant le phénomène de fongostase

— "Semi-micro" méthode de KLARMANN et WRIGHT (30)

Principe de la technique

Dans des tubes à test de 22 × 150 mm. on place 0,01 ml. de suspension de spores, on maintient ces tubes au bain-marie à 20° C, à chacun de ces tubes on ajoute 0,1 ml. du désinfectant dilué à étudier, on mélange soigneusement. Au bout de 10 minutes 20 ml. de bouillon dextrosé lequel contient 2 % de "bacto-oxgall" sont ajoutés à chacun des tubes. On laisse incuber deux semaines à 28° C. et on note les résultats.

— "The agar cup plate method" ou technique de BURHINGAME et REDDISH (52).

Cette technique est modifiée par TAFT.

Les expériences sont faites sur Trichophyton mentagrophytes. On fait un milieu de Sabouraud contenant du dextrosé et de l'agar-agar, à ce milieu on ajoute 10 % de sérum stérile et normal de cheval, il faut opérer le plus aseptiquement possible. On verse 20 cm3 de ce mélange dans les boites de Pétri de 10 cm ; 15 cm3 de ce mélange sont inoculés avec 0,5 cm3 d'une suspension conidienne de Trichophyton mentagrophytes, (laquelle contient 5 millions de conidies par cm3) ce milieu est encore versé dans les boites de Pétri préparées précèdemment.

A l'aide d'un tire-bouchon foreur stérile de 2 cm, un trou uniforme est fait dans le centre de chaque boite de Pétri, ce trou est ensuite fermé par quelques gouttes d'agar-agar stérile.

Le produit à tester était au préalable mélangé à 95 % d'éthanol et pipeté dans la coupe centrale en quantité de 1 cm3. On laisse incuber à une température de 28° à 30° C pendant 5 jours. Les zônes d'inhibition sont mesurées, et sont représentées par la distance séparant le bord le plus proche de la coupe à la pousse fongique.

Des tests de contrôle utilisant 95% d'éthanol pur montrent des zônes d'inhibition négligeables.

Vingt produits tensio-actifs du commerce furent expérimentés par cette technique à la concentration de 0,1 % dans 95 % d'éthanol. Le chlorure de lauryl-pyridinium semble être assez actif et présente une zône d'inhibition de 19 mm.

— "The isolated disk Technique" ou méthode de GOLDEN et OSTER (52).

Cette méthode utilise les concentrations de 1 % d'antiseptique dans 95 % d'éthanol. Le champignon expérimenté est ici encore le trichophyton mentagrophytes.

Ce champignon est cultivé 15 jours sur le milieu de Sabouraud contenant agar-agar et dextrose ; ce milieu est ensuite coupé en disques de 1 cm de diamètre au moyen d'un emporte-pièce stérile. Ces disques sont ensuite immergés 10 minutes dans la solution du produit à tester, on rince ensuite de la façon suivante :

— 5 minutes dans une solution à 60 % de poly-éthylène-glycol.
— 5 minutes dans une solution à 30 % d'acétone.
— 3 minutes dans un bouillon stérile.

Puis on repique ces disques sur des couches stériles de milieu de Sabouraud contenant agar-agar et dextrose. Les observations sont faites au bout de 21 jours d'expérience. Aucun des agents tensio-actifs expérimentés n'était efficace à la concentration de 1 % et exposé pendant 1 minute, sauf le chlorure de lauryl-pyridinium.

Cette substance est aussi fongicide à 0,50 % mais non à 0,30 %.

Les tests de contrôle sont faits avec immersion dans 95% d'éthanol, ces immersions dépassent même 10 minutes, les rinçages sont ceux indiqués précèdemment, on observe ici une croissance de champignons.

3°/- Techniques chimiques de dosage des ammoniums quaternaires.

Une récente mise au point et étude critique de ces techniques a été faite par Badinand. (4)

La plupart des méthodes chimiques sont basées sur une réaction décrite en 1943 par AUERBACH (3), cette réaction est dans son principe la suivante = formation d'un sel complexe entre un colorant sulfonique halogène tel le bleu de bromophénol, le bleu de bromothymol, l'éosine, le rouge Congo, etc.. et le sel d'ammonium quaternaire. Le colorant soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques passe dans ces solvants sous la forme du complexe formé. AUERBACH employait d'abord le dichloréthylène mais devant les difficultés rencontrées pour l'obtenir anhydre après la séparation, il emploie ensuite le benzène (3). Cette réaction est faite en présence de carbonate de soude en quantité déterminée mais sans préciser le pH de la réaction. Le dosage est terminé par colorimétrie à l'électrophotomètre.

En 1951, PIEN et ses collaborateurs (38) utilisent cette réaction pour rechercher et doser dans le lait, les ammoniums quaternaires qui ont pu servir au nettoyage et à la désinfection des récipients. Ils opèrent avec le bleu de bromophénol et le chloroforme après défécation acétique, puis passage en milieu alcalin, mais sans précision de pH.

Parmi les premiers à signaler la précision indispensable du pH citons GOTTLIEB (24).

Les nombreux auteurs qui ont appliqué cette méthode insistent sur sa précision, sa sensibilité et sa spécificité, cependant certaines critiques sont faites par COLICHMAN ( 14 ), il signale l'importance de l'erreur due à l'évaporation et aux difficultés de mesurer d'une manière précise des solvants organiques. Il supprime alors ceux-ci et utilise une quantité fixe et définie de bleu de bromophénol dont la solution est colorimétrée à pH déterminé. Après cettte importante modification COLICHMAN étudie les conditions de la formation du complexe colorant-ammonium quaternaire. Il détermine ce qu'il appelle la " critical micelle concentration " ou concentration limite d'ammonium quaternaire à partir de laquelle il y a formation de micelles.

# DEUXIEME PARTIE

## RECHERCHES PERSONNELLES

# CHAPITRE I

Nous avons déjà fait allusion à l'emploi peut-être maintenant répandu des ammoniums quaternaires pour le lavage des diverses cuves à fermentation, soit dans les brasseries, soit dans la fermentation vinaire ; nous connaissons le grand pouvoir tensio-actif de ces principes et leur pouvoir aphrogène qui leur confère cette capacité de pénétrer dans tous les interstices. Il est certain que le matériel s'imprègne et un rinçage négligé n'élimine pas absolument ces produits antiseptiques, d'où la possibilité de leur intervention au cours des processus fermentaires qui auront lieu dans ces cuves.

Les levures et en particulier le Saccharomyces Cerevisiae sont-ils sensibles à ces détergents cationiques, quel est le degré de sensibilité ; telles sont les deux questions auxquelles nous essayons de répondre à la lumière des quelques expériences qui vont suivre.

## EXPERIENCES METTANT EN ŒUVRE LES LEVURES

### A/- Expérience sur moût de bière : ensemencement par saccharomyces Cerevisiae Hans.

#### Principe de l'expérience =

La forme levure étant une forme anaérobie, sa présence et son développement se traduisent par une opacité du milieu et un dégagement de bulles de gaz carbonique ( $CO_2$ ) facile à déceler et mesurer.

Nous avons choisi la levure de Bière ou Saccharomyces Cerevisiae Hans (1) (souche basse des Brasseries) que nous ensemençons dans son milieu de prédilection, le moût de Bière.

## Technique expérimentale

Nous préparons une suspension de levure de Bière sélectionnée dans du moût, cette opération consiste à mettre des cellules de Saccharomyces Cerevisiae en suspension dans une petite quantité de moût, nous homogénéisons le plus possible cette suspension à l'aide d'une petit agitateur de verre stérile.

Dans une seconde opération, nous diluons le moût concentré qui constituera le milieu dans lequel nous ensemencerons la suspension de cellules de Saccharomyces Cerevisiae préparée précédemment ; la dilution de ce milieu se fait avec de l'eau distillée.

L'expérience se fait dans des tubes stériles de 20cm de long sur 2cm de diamètre : la conduite de l'expérience nécessite l'emploi de 7 tubes, 2 sont les tubes témoins (T1 et T2).

Dans chaque tube, nous versons 10 cm3 de moût, puis 1 cm3 de suspension de levure, (cette dernière quantité rigoureusement mesurée) nous ajoutons ensuite des doses croissantes d'une solution de Desogène à 0,2 % laquelle est préparée extemporanément à partir de la solution commerciale laquelle est à 10 %. Nous ferons le plein à 20 cc avec l'eau distillée.

---

(1) — Il nous est un bien agréable devoir de remercier ici, Mr. AREND, directeur technique de la Brasserie " Le Phénix " de Marseille, qui nous a fourni gracieusement cette levure.

Les tubes T (témoins) ainsi que les tubes d'expérience reçoivent tous 20 cm3 de liquide plus 1 cm3 de suspension de Saccharomyces Cerevisiae.

Parmi les tubes d'expérience :

— le tube 1 reçoit une quantité de solution de Desogène telle qu'il titre 0,0030 gr. % en ammonium quaternaire
— le tube 2 titre 0,0032 gr. % — „ —
— le tube 3 titre 0,0034 gr. % — „ —
— le tube 4 titre 0,0040 gr. % — „ —
— le tube 5 titre 0,0050 gr. % — „ —

Nous homogénéisons le plus possible à l'aide de petits agitateurs de verre, stériles.

Interprétation des résultats

La conduite de l'expérience consiste à noter, à intervalles réguliers, au fur et à mesure de la prolifération de Saccharomyces Cerevisiae, l'intensité de la fermentation, et d'autre part la multiplication des cellules.

— L'intensité de fermentation se traduit par un dégagement de $CO_2$ mis en évidence par de petites bulles recueillies dans de petites cloches à gaz placées dans chacun des tubes.

— La multiplication des cellules levure se manifeste par un accroissement de l'opacité du milieu, nous pouvons mesurer cette opacité par nephelemètrie.

Déjà deux heures après la mise en train de notre expérience nous notons les résultats, ces résultats sont notés d'abord à intervalle de 2 heures puis ensuite à intervalle de une heure ; nous notons l'évolution de la fermentation en huit heures.

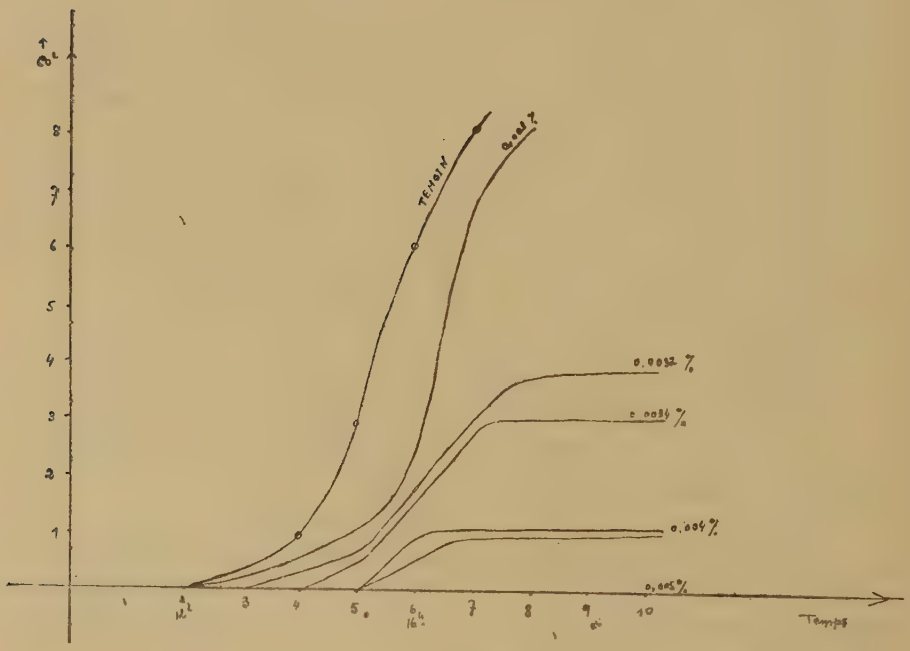
Le tableau ci-dessous, et la courbe ci-après, nous permettent de constater un net retard dans le démarrage du processus fermentaire et un arrêt pour la concentration de 0,0050 % soit 5/100.000.

| Temps | T. 1 | T. 2 | 0,0030% | 0,0032% | 0,0034% | 0,0040% | 0,0050% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 h | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 h. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 h. | 1 | 1 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0 | 0 |
| 5 h. | 3 | 3 | 1 | 0,8 | 0,4 | 0,1 | 0 |
| 6 h. | 6 | 6,5 | 3,5 | 2 | 1,8 | 0,5 | 0 |
| 7 h. | 8 | 8 | 7,5 | 3 | 2,9 | 1 | 0 |

Ce tableau a été établi en nous basant. sur l'appréciation du CO2 dégagé au cours du processus fermentaire.

En effet, si 8 représente le maximum de CO2 dégagé par la fermentation, maximum atteint par les deux témoins pendant la durée de l'expérience, la comparaison par rapport à ces témoins donne pour les tubes tests les valeurs inscrites sur ce tableau.

*Légende.* — Courbes de fermentation du moût de bière par S. CEREVISIAE.
A gauche courbe témoin.
A droite courbes obtenues dans des milieux contenant des concentrations croissantes de désogène.
Ordonnée : Co 2 en cc.
Abscisse : Temps en heures.




Cette méthode ne prétend pas donner un dosage précis mais plutôt une appréciation de l'activité des ammoniums quaternaires sur le Sacchoromyces Cerevisiae.

La mesure nephelemétrique est sans doute supérieure, mais il s'est présenté de nombreuses difficultés dans le mode opératoire, entre autre le manque d'homogénéité du milieu sur lequel nous expérimentons dans ce cas particulier.

Conclusions de l'expérience

Cet essai permet de mettre en évidence l'action des ammoniums quaternaires sur le Sacchoromyces Cerevisiae.

Cette action se traduit par un retard du démarrage du processus fermentaire, ce retard est une inhibition partielle puisque la fermentation est ici 2/3 inférieure à celle que présente les témoins, cette inhibition partielle se fait pour les doses de :

0,0032 %, soit 3,2 / 100.000

L'inhibition totale est observée pour les doses de

0,0050 %, soit 5 / 100.000

cela pour le temps de l'expérience, c'est-à-dire 8 heures.

Cette expérience semble nous permettre de conclure que les levures sont assez sensibles à l'action de ces antiseptiques cationiques.

Remarque importante

Des essais préliminaires dits de tatonnements faits avec des concentrations très variées de Desogène ont précédé cette expérience dont nous donnons le tableau.

Entre autres essais, citons celui pour lequel nous avions utilisé des concentrations allant de 0,009 % à 0,0054 % d'ammonium quaternaire, dans cet essai la fermentation était inexistante pour les tubes contenant ces quantités d'antiseptique, tandis qu'elle suivait son évolution normale dans les tubes témoins; nos concentrations étaient d'une façon très évidente trop fortes.

B/ - Expériences sur le moût de raisin

Le but de ces expériences consiste à rechercher d'une part l'activité et éventuellement l'action inhibitrice des ammoniums

quaternaires sur les levures intervenant au cours de la fermentation vinaire, et d'autre part le pouvoir stabilisateur vis-à-vis des champignons saprophytes par exemple, les moisissures vertes ou blanches qui apparaissent spontanèment dans les milieux septiques.

Technique expérimentale

Cette méthode consiste à laisser fermenter spontanément du jus de raisin frais, obtenu par pressage de raisins et réparti dans de petites cuves à fermentation de 20 cm. de diamètre.

La conduite de notre expérience nécessite 17 cuves dont deux seront des témoins et ne recevront que du môut de raisin, soit 250 cc.

Les autres cuves reçoivent chacune 250 cc. de moût, plus des quantités croissantes de solution de désogène à 1% préparée extemporanément à partir de la solution commerciale à 10%. Nous avons utilisé les concentrations suivantes:

| | | |
|---|---|---|
| cuve 1 | = 0,02 %o | d'ammonium quaternaire |
| cuve 2 | = 0,03 %o | — „ — |
| cuve 3 | = 0,04 %o | — „ — |
| cuve 4 | = 0,06 %o | — „ — |
| cuve 5 | = 0,08 %o | — „ — |
| cuve 6 | = 0,12 %o | — „ — |
| cuve 7 | = 0,14 %o | — „ — |
| cuve 8 | = 0,18 %o | — „ — |
| cuve 9 | = 0,20 %o | — „ — |
| cuve 10 | = 0,24 %o | — „ — |
| cuve 11 | = 0,28 %o | — „ — |
| cuue 12 | = 0,32 %o | — „ — |
| cuve 13 | = 0,40 %o | — „ — |
| cuve 14 | = 0.80 %o | — „ — |
| cuve 15 | = 1,20 %o | — „ — |

Ces cuves, ainsi que les deux témoins sont alors laissés incubés dans des conditions favorables à la fermentation soit à la température de 12° à 15°. Ce temps d'incubation dure deux semaines, pendant ces deux semaines nous observons quotidiennement nos cuves et notons minutieusement nos observations et résultats.

La mise en évidence de la fermentation se fait ici encore comme précédemment pour le moût de bière

1°/· par une dégagement de CO 2

2°/· par une prolifération des cellules des sacchoromyces agents de la fermentation.

La mesure de la fermentation a fait l'objet d'une estimation approximative basée sur l'intensité du dégagement de gaz carbonique, ce dégagement gazeux est apprécié par comparaison des cuves d'expérience les unes par rapport aux autres et par rapport aux témoins de l'expérience. Nous avons essayé sans succès de l'apprécier par l'évaluation de la multiplication des cellules de la levure, mais cette techniqne est ici très difficilement applicable.

Résultats expérimentaux =

— *Les deux premiers jours,* aucun phénomène n'est perceptible ni dans les cuves témoins, ni dans les autres cuves.

— *A partir du 3me jour,* la fermentation se déclenche d'abord chez les deux témoins puis dans les cuves de faibles concentrations soit :

0,02 °/₀o  0,03 °/₀o  0,04 °/₀o  0,06 °/₀o  0,08 °/₀o

Après cette phase d'induction, la fermentation est à peu près identique en intensité dans toutes les cuves citées ci-dessus.

— *Au 4ème jour,* les résultats notés deviennent plus précis et plus intéressants, la fermentation a démarré dans les cuves dont la concentration est représentée par les valeurs :

0,12 °/₀₀ et 0,14 °/₀₀

tandis que dans les cuves

0,02 °/₀₀ 0,03 °/₀₀ 0,04 °/₀₀ 0,06 °/₀₀ 0,08 °/₀₀

la fermentation s'est encore accrue.

Il convient de noter qu' à ce 4ème jour d'expérience est apparu dans certaines cuves un feutrage blanc qui parait être le tapis mycelien d'un champignon saprophyte. Cette apparition est d'autant plus intéressante que le tapis mycelien est à peine existant dans les cuves témoins et dans les cuves de faibles concentrations, c'est-à-dire =

0,02 °/₀₀ 0,03 °/₀₀ 0,04 °/₀₀

alors que sa présence est nette dans les cuves de concentrations

0,12 °/₀₀ 0,14 °/₀₀ 0,18 °/₀₀ 0,20 °/₀₀ 0,24 °/₀₀

La première idée qui nous est venue à l'esprit après cette observation est la suivante : l'apparition de ce tapis mycelien saprophyte ou feutrage blanc serait-il l'indice de la présence dans le milieu d'un ammonium quaternaire, on pourrait être tenté de le penser si l'on ne savait les propriétés antiseptiques de ces substances.

Nous donnons ici les schémas des colonies myceliennes, de leur surface, et de leur nombre dans les cuves d'expérience témoins et traités. Ces schémas représentent l'aspect de la surface du moût au 4me jour d'expérience.

*Ce tableau met en évidence un phénomène en apparence paradoxal : le développement des colonies de champignons saprophytes* (impossible pour l'instant à déterminer) *est proportionnel à la dose de l'hydrate d'ammonium quaternaire appliquée (pour des concentrations variant de 0,02 à 0,28 °/₀₀.*

Mais un examen plus attentif de l'expérience nous autorise à formuler deux constatations.

a/- il est à remarquer que malgré tout, les cuves ayant reçu respectivement 0,02 ou 0,03 °/oo d'ammonium quaternaire sont moins polluées que les cuves témoins.

b/- les cuves ayant reçu de fortes concentrations, c'est-à-dire de l'ordre de 0,80 à 1,20 °/oo sont pour l'instant peu ou pas atteintes par le développement du champignon. Ce n'est qu'après le 9me jour que ces cuves seront envahies.

Jusqu'ici donc, nous pourrions admettre que les faibles dilutions comme les fortes concentrations ont un effet fongostatique (retardateur du développement mycelien) tandis que les doses moyennes s'avèrent n'être ni fongicide ni fongostatique.

Il y a lieu de rapprocher ces résultats des observations de KLARMANN et WRIGHT qui ont insisté sur ce phénomène de fongostase difficilement interprétable en soi et gênant pour la conduite d'une expérience dont il masque et fausse les résultats à tel point que ces auteurs ont cherché à utiliser des neutralisants du phénomène de fongostase qui est particulièrement prononcé pour le groupe des ammoniums quaternaires.

— Au 5me jour

a/- du point de vue fermentation, on obtient une stabilisation du phénomène, c'est-à-dire que les quantités de CO2 dégagé atteignent la même valeur dans les cuves témoins et dans les cuves dont la concentration est comprise entre 0,02 et 0,14 °/oo.

b/- du point de vue du développement du champignon saprophyte de surface, l'évolution du processus est intéressante à suivre.

Nous constatons que l'édification de l'appareil de multiplication asexuée (conidiophores porteurs de conidies) se fait, cette édification se manifeste par la coloration verte des pinceaux conidiens des aspergillacées. Ce phénomène se manifeste avec des valeurs inégales dans les cuves de concentration comprises de 0,006 °/oo à 0,24 °/oo.

— Au 6ème jour

On constate que :

a/- La fermentation vinaire ( étale dans les cuves titrant de 0,02 à 0,14 °/₀₀ ) apparaît d'une manière à peine perceptible (o) dans les cuves dont la concentration est de 0,18 à 0,20 °/₀₀.

b/- Les aspergillacées saprophytes qui tapissent la surface du moût dans les cuves peuvent être déterminées. Elles sont constituées pour la plus grande part par du Penicillium glaucum variété Roquefortii, dont il n'est pas inutile de dire que les multiples travaux entrepris à son sujet dans le laboratoire, permettent d'expliquer la présence et la dominance par rapport aux autres espèces.

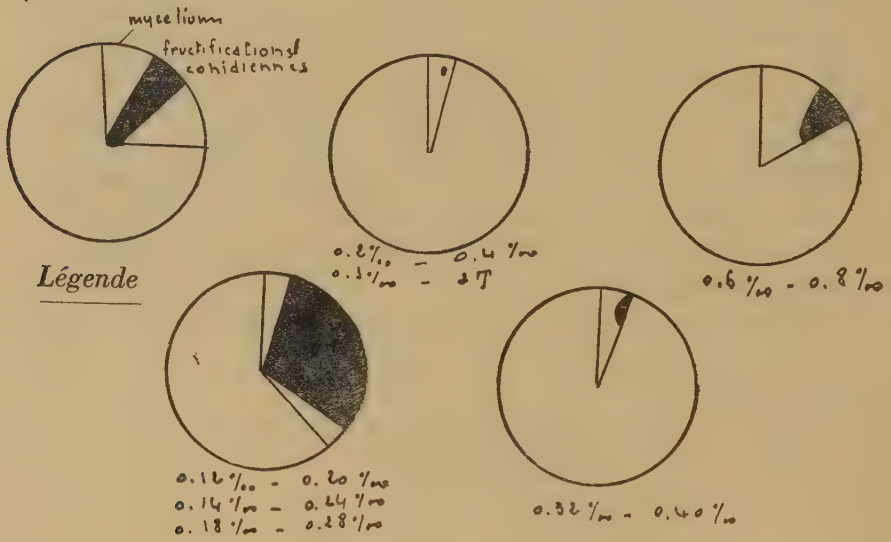
Le mycelium s'est étendu dans les cuves titrant :

0,28 °/₀₀ 0,32 °/₀₀ 0,40 °/₀₀

Schéma de l'appareil conidien du Penicillium glaucum variété Roquefortii. Conidiophore court, trapu, typiquement asymétrique.

(o) - de rares bulles de CO 2 se présentent collées contre les parois du récipient.

Nous avons voulu exprimer dans le tableau ci-après la proportion qui existe à la surface du moût contenu dans les cuves, entre la surface du mycelium et celle de la zône de "fructification" conidienne verte.




Schémas montrant la surface du moût envahie par la colonie d'aspergillacées (en blanc, mycelium, en noir et au sein du mycelium la zone de fructification conidienne).

Un fait important est ici à signaler pour l'hydrate d'ammonium quaternaire : les doses moyennes dont nous avons dit qu'elles ne possèdaient pas de pouvoir retardateur du développement mycelien, ne manifestent pas non plus d'action retardatrice sur l'édification des conidies asexuées. En d'autres termes *ces doses ne sont pas fongostatiques*, même si l'on confère à ce vocable l'action inhibitrice de la "sporulation" (o) ou de la multiplication asexuée.

(o) - Le vocable de sporulation doit être entendu ici comme l'équivalent de processus de l'édification des spores asexuées.

— Au 9ème jour d'expérience

Nous constatons l'apparition de colonies de moisissures vertes dans les cuves de fortes concentrations : c'est-à-dire dont les concentrations sont représentées par

0,80 °/₀₀ et 1,20, °/₀₀

D'autre part la fermentation débute dans les cuves de concentration 0,18 °/₀₀ et 0,20 °/₀₀.

Nous notons également que dans les cuves de concentrations suivantes

2 témoins 0.02 °/₀₀ 0,03 °/₀₀ 0,04 °/₀₀

la " sporulation " qui se traduit macroscopiquement par le verdissement des pinceaux conidiens, reste toujours très faible presque inexistante.

— Au 10ème jour

Une faible fermentation apparaît dans toutes les cuves dont la concentration se situe au-dessus de 0,20 °/₀₀, c'est-à-dire :

0,24 °/₀₀ 0,28 °/₀₀ 0,32 °/₀₀ 0,40 °/₀₀ 0,80 °/₀₀ 1,2 °/₀₀

mais son intensité est très faible.

Dans le but de vérifier les observations ci-dessus rapportées nous avons, au terme de l'expérience sur la fermentation vinaire pratiqué 2 sortes de dosages, l'un portant sur le glucose restant dans le substrat contenu dans les cuves ; l'autre sur l'alcool formé au cours de l'expérience.

Dosage du glucose

Ce dosage a été opéré suivant la méthode iodométrique de Mr. le Professeur DUMAZERT ( 20 ).

Technique opératoire :

Pour faire ce dosage nous diluons au 1/25e, le moût contenu dans les cuves : nous le déféquons en ajoutant à 1 cm3 de la dilution, 8 cm3 de réactif cadmique et 1,1 cm3 de NaOH N, nous agitons, puis nous filtrons.

Pour le témoin, 1 cm3 de la dilution est remplacé par 1 cm3 d'eau distillée.

On ajoute ensuite à tous les tubes y compris les témoins 5 cm3 de réactif tampon Dumazert et 2 cm3 d'I N/20, on laisse ensuite à l'obscurité 1/2 heure, les tubes étant bien bouchés. Au bout de ce temps, nous ajoutons 3 cm3 de $SO_4H_2$ N, nous agitons puis 20 secondes après 10 cm3 de sol. de borate, nous faisons alors le dosage par $S_2O_3Na_2$ N/200 en présence d'empois d'amidon.

Ce dosage est fait au départ sur le moût frais, nous notons 72 g. de glucose par litre.

Résultats des dosages :

Les dosages ainsi faits permettent de construire la courbe ci-après ; par cette courbe nous voyons que pour les doses faibles (fongostatique) les quantités restantes de glucose sont proportionnelles aux doses appliquées.

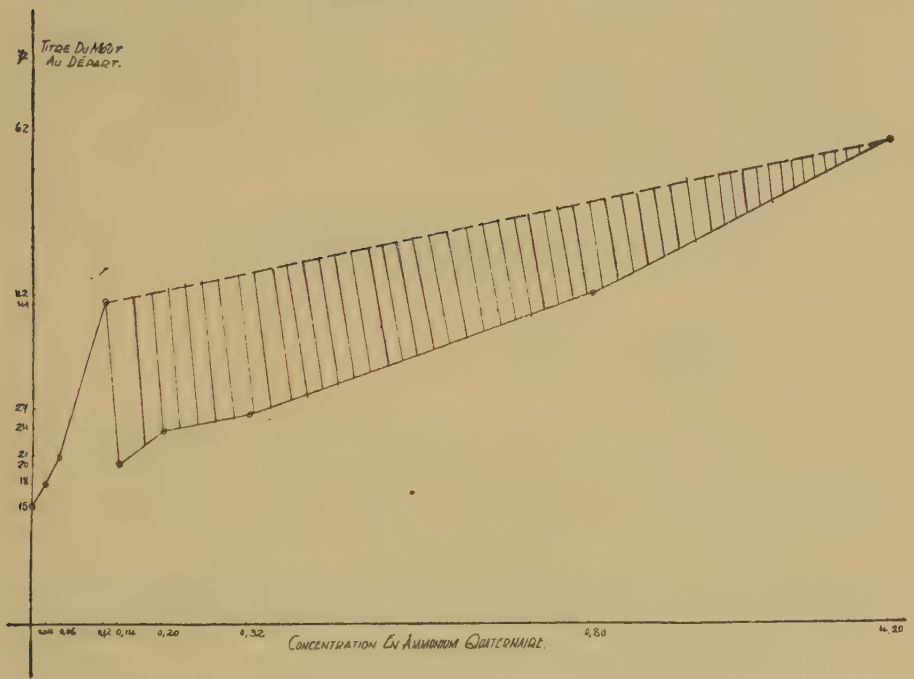
D'autre part pour les doses moyennes l'effondrement de la courbe (indiqué par une zone hachurée) traduit la consommation du glucose du substrat par les colonies de champignons saprophytes qui pullulent dans les cuves.

Enfin, avec les concentrations fortes en ammonium quaternaire on retrouve une quantité de glucose voisine de celle du moût au départ (en effet le principe appliqué atteint ici son pouvoir fongicide).

*Légende :*

en pointillé, courbe théorique :
en trait plein, courbe caractérisée par un effondrement (zône hachurée) qui correspond à la consommation de glucose.
- en ordonnée : glucose en Gr./Lt
- en abscisse : concentration en ammon. quaternaire / Lt.

Courbe de dosage du glucose en fin d'expérience.




## Dosage de l'alcool

### Technique opératoire (27)

Dans une fiole jaugée on a mesuré 200 ml. de vin à une température aussi voisine que possible de 15°. On verse le vin dans le ballon d'un appareil distillatoire relié à un réfrigérant.

On neutralise par addition d'une petite quantité de soude, on ajoute un peu de poudre de pierre ponce, puis on distille. La réfrigération doit être suffisante pour que le liquide condensé s'écoule à une température aussi voisine que possible de 15°.

A l'extrémité du tube du réfrigérant on adapte au moyen d'un tube de caoutchouc, un tube de verre qui plonge jusqu'au centre d'un ballon jaugé de 200 ml. destiné à recueillir le distillat. On arrête la distillation quand on a recueilli les 2/3 environ du contenu du ballon. On amène le ballon et son contenu à une température aussi voisine que possible de 15°, on complète le volume à 200ml. et, après agitation, on prend la température et le degré alcoolique avec un alcoomètre soigneusement vérifié; on fait la correction.

Ces conditions sont celles précisées officiellement dans l'arrêté paru au journal officiel du 22 Janvier 1907.

## Résultats des dosages

Les dosages, dans les conditions exposées ci-dessus faits sur le moût contenu dans les cuves après une incubation de 2 semaines environ, nous ont permis de dresser la courbe ci-après.

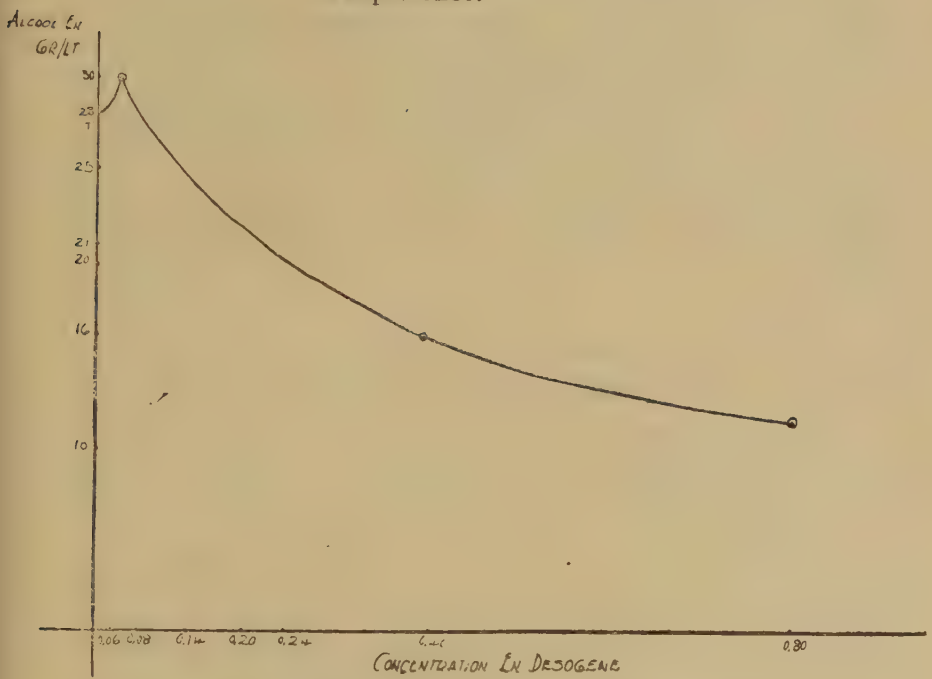
Nous constatons que cette courbe à quelques accidents près, suit la courbe de la fermentation établie en fonction du dégagement de CO2.

En effet, cette courbe est descendante, l'affaiblissement de la fermentation traduite ici pour des quantités décroissantes d'alcool, est proportionnel aux concentrations en ammonium quaternaire; pour des doses fortes en ammonium quaternaire 0,8°/₀₀ la quantité d'alcool en grammes par litre est nettement inférieure à celle du témoin ou celle des faibles concentrations.

*Légende*

- en abscisse : concentration en ammonium quaternaire /Lt
- en ordonnée : alcool en Gr/Lt de moût fermenté.

Courbe de dosage de l'alcool en fin d'expérience.




La courbe ci-après représente l'évolution de la fermentation en présence de concentrations croissantes en ammonium quaternaire et l'apparition simultanée de champignons saprophytes.

Nous notons pour les doses faibles une fongostase combinée avec l'action antiseptique de l'alcool car ici la fermentation est à peu près normale.

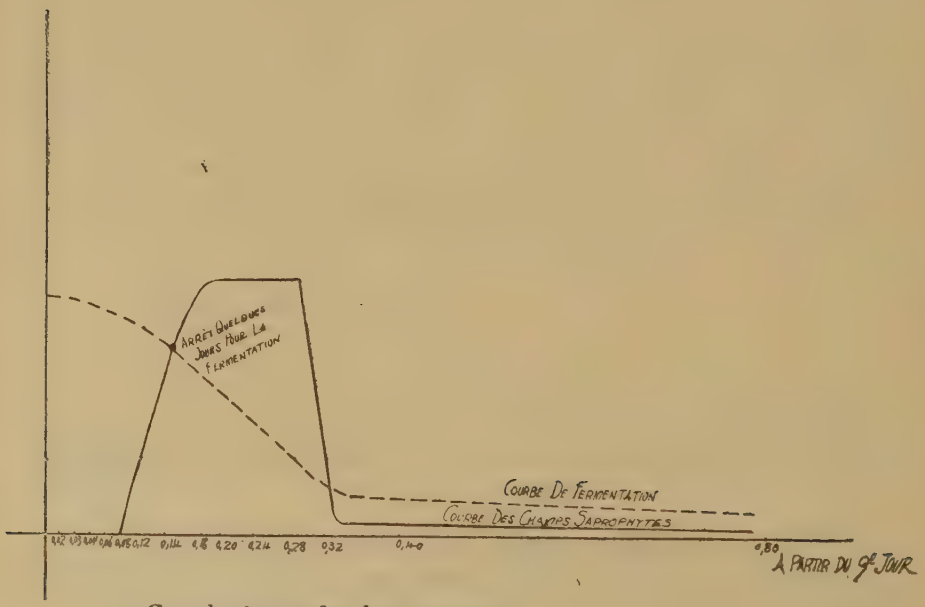
Pour les doses moyennes, un retard et une nette diminution du dégagement de $CO_2$ sont notés tandis que les champignons saprophytes pullulent dans ces cuves.

Pour les doses fortes la fermentation est pratiquement bloquée, les champignons saprophytes subissent à nouveau une fongostase, l'ammonium quaternaire agit par fongostase vraie.

*Légende :*

Trait plein : courbe de développement des moisissures saprophytes.

Trait pointillé : courbe de développement de la fermentation appreciée par le dégagement de $CO_2$.




## Conclusions de l'expérience

Cette expérience nous conduit à 3 catégories de conclusions:

1°/- un fait important mérite d'être signalé : ce sont les cuves titrant 0,02 °/₀o et 0,03 °/₀o de désogène qui offrent les plus petites colonies d'apergillacées : viennent ensuite les cuves-témoins, puis les cuves de concentration 0,04 °/₀o, 0,06 °/₀o et 0,08 °/₀o.

*L'hydrate d'ammonium quaternaire présente ici une incontestable action fongostatique* mais il est curieux de constater que ce phénomène paraît inversement proportionnel aux doses de désogène appliquées. Nous inclinons à penser, que, en réalité des doses de désogène de l'ordre de 0,02 et 0,03 °/₀₀ sont vraisemblablement trop faibles pour déclencher un phénomène de fongostase vraie; dès lors nous interprétons le comportement de ces cuves de la façon suivante:

— la fermentation par formation d'alcool et de CO2 ( en quantités aussi grandes que dans les témoins ) ajoute peut-être son action antiseptique à celle du désogène, on sait d'ailleurs que l'alcool sensibilise l'action toxique des hydrates d'ammonium quaternaires.

2°/- *Les cuves de concentrations moyennes*, c'est-à-dire celles où le désogène est appliqué aux concentrations de

0,12 °/₀₀ 0,14 °/₀₀ 0,18 °/₀₀ 0,20 °/₀₀ 0,28 °/₀₀

sont essentiellement caractérisées en fonction des doses appliquées.

a/- par un retard de la fermentation

b/- par l'abondance des colonies de champignons saprophytes

Nous en concluons que, appliqué à ces doses, le désogène inhibe plus ou moins totalement le processus de la fermentation par inhibition des divers saccharomyces présents au cours de la vinification. En d'autres termes le produit appliqué est fongicide pour les levures.

Par contre, nous sommes plus embarassés pour interpréter l'action accélératrice de l'ammonium quaternaire sur l'aspergillacée saprophyte, il semble en effet que d'une part la croissance mycelienne, d'autre part l'édification de l'appareil conidien ne sont nullement affectés par ces doses; autrement dit, il n'y a pas d'effets fongostatiques ni d'action fongicide.

3°/- *Les cuves de concentration fortes,* c'est-à-dire celles titrant en désogène

0,32 °/₀₀ 0,40 °/₀₀ 0,80 °/₀₀ 1,20 °/₀₀

sont caractérisées par une fermentation très étalée et très faible en intensité.

Quant au mycelium saprophyte il existe ici mais occupe une beaucoup moins grande surface que dans les cuves de concentrations moyennes. L'activité fongostatique du Désogène se précise et il est indiscutable que c'est au seul ammonium quaternaire que nous devons l'inhibition partielle du développement mycelien et de la construction du système de multiplication asexuée.

Remarque

Nous savons que le terme de fongostase est appliqué suivant les auteurs au ralentissement du développement mycelien ou au ralentissement de la formation des pinceaux conidiens. Dans les cas présents, l'action fongostatique se traduit à la fois sous ces deux aspects; c'est ainsi que dans les faibles et fortes concentrations en Désogène où pour des raisons différentes nous observons une fongostase, mycelium et conidies sont peu développés. Dans les concentrations moyennes où nous n'admettons pas de fongostase, mycelium et conidies sont remarquablement développés. Nous sommes tentés de conclure dans un cadre plus général que ces deux phénomènes sont pratiquement indissociables.

Une expérience identique à celle que nous venons d'exposer a été faite et vérifie les résultats donnés.

Une chose cependant est à signaler, l'apparition au cours de cette seconde expérience, simultanément, avec le Penicillium, de Rhizopus, caractérisé par ses spores noires. Pour ce champignon la fongostase est encore ici visible, en effet :

Les témoins et les cuves de faibles concentrations ne contiennent pas de rhizopus.

Les cuves titrant de 0,15 °/₀₀ à 0,32 °/₀₀ en Désogène, présentent en coexistance le Penicillium et le rhizopus, cependant dans la cuve de concentration 0,32 °/₀₀ le rhizopus dépasse le Penicillium.

Au point de vue sporulation, alors que celle-ci est très faible pour les cuves de concentrations comprises entre 0,15 °/₀₀ et 0,24 °/₀₀, elle est très abondante dans celles de concentrations 0,24 °/₀₀ et 0,32 °/₀₀, cette dernière présentant le maximum.

Le rhizopus exige-t-il des doses fongostatiques plus fortes que celles nécessaires pour le Penicillium, cette expérience porterait à le croire.

Détermination de la dose liminaire fongicide d'ammonium quaternaire ( désogène ) pour les Aspergillacées saprophytes apparus spontanément à la surface du moût de raisin.

L'expérience précitée ne nous a pas permis d'établir la dose fongicide à l'égard des champignons saprophytes (aspergillacées en particulier) spontanément développés à la surface des moûts, il semble cependant qu'il y ait intérêt à aborder ce problème qui revient à poser le principe de l'utilisation des hydrates d'ammonium quaternaires comme antiseptiques en oenologie.

Technique expérimentale =

Notre technique se décompose en deux opérations

a/- la première consiste à obtenir une colonie d'aspergillacées, cela à partir d'un prélèvement de mycelium fait à la surface du moût d'une cuve-témoin, ( 1 ) c'est-à-dire n'ayant eu aucun contact avec l'ammonium quaternaire expérimenté, ceci afin d'éviter l'ensemencement de souches résistantes.

b/- la seconde consiste à ensemencer l'aspergillacée obtenue par l'opération précèdente sur un milieu contenant les concentrations testées de Désogène.

Repiquons un prélèvement de mycelium blanchâtre pris à la surfaee d'une cuve témoin, sur un milieu de Raulin neutre. Ce milieu se compose de :

( 1 ) ( la diagnose de l'espèce (37) effectuée à la lumière de l'ouvrage du Dr J.J. MEIS a montré qu'il s'agissait du Penicillium glaucum, variété Roquefortii dont notre laboratoire est malheureusement envahi).

| | |
|---|---|
| eau | 1.500 grs |
| sucre candi | 70 grs |
| tartrate neutre de K | 6,50 grs |
| nitrate d'ammonium | 4,50 grs |
| Phosphate de K | 0,60 grs |
| Carbonate de Mg | 0,40 grs |
| Sulfate de K | 0,25 grs |
| Sulfate de Zn | 0,07 grs |
| Sulfate de fer | 0,07 grs |
| Silicate de K | 0,07 grs |

La neutralité est vérifiée par mesure de pH au comparateur de Hellige ou au pHmètre de Voiret.

20 cm3 de ce milieu sont coulés dans une boite de Petri stérile, le milieu a lui-même été stérilisé au préalable, puis nous ensemençons généreusement. Laissons incuber. Au bout de 4 jours déjà une colonie d'aspergillacées est formée à la surface du milieu. C'est à partir de cette colonie que nous continuons notre expérience.

La seconde opération permettra d'établir les doses liminaires fongostatiques et fongicides du produit testé, vis-à-vis de la moisissure verte saprophyte.

La conduite de l'expérience nécessite 6 boites de Petri, dans chacune d'elles nous coulons 15 cm3 de jus de raisin fraîchement préparé par pressage; puis dans chacune d'elles, (sauf deux que nous prenons pour témoins) nous introduisons des doses croissantes d'une solution de Désogène à 1 % préparée extemporanément à partir de la solution à 10 % du commerce, de façon à avoir les concentrations suivantes:

| | | |
|---|---|---|
| cuve 1 | 1,20 %o | de Désogène |
| cuve 2 | 2,40 %o | — „ — |
| cuve 3 | 4,80 %o | — „ — |
| cuve 4 | 9,60 %o | — „ — |

Puis toutes les cuves y compris les deux témoins sont ensuite largement ensemencées avec l'aspergillacée mère obtenue par

culture sur milieu de Raulin neutre. On laisse incuber 40 jours à une température normale de 12 à 15°C.

Résultats de l'expérience :

Dès le 3ème jour apparaissent à la surface des boites témoins des taches blanches qui sont les premiers indices de la pousse fongique tandis que rien n'apparait dans les boites d'expérience.

Le 4ème jour les témoins se couvrent d'un abondant feutrage blanc qui n'est pas autre chose que le tapis mycelien du champignon ensemencé, tandis que les boites d'expériences n'ont pas changé d'aspect.

Enfin au 5ème jour, les témoins sont couverts de spores vertes, les conidiophores porteurs de conidies ont apparu, le champignon se développe suivant son processus normal.

Ce n'est qu'au 40ème jour d'incubation qu'une petite colonie rabougrie d'abord blanche puis verte apparait à la surface de la boite ayant une concentration de 1,20 °/₀₀ en Désogène.

Nous concluons donc que :

La dose fongostatique qui est la dose provoquant un grand retard du développement mycelien, (ce retard est ici de 36 jours par rapport aux témoins de l'expérience) est ici de 1,20°/₀₀ de Désogène donc :

1,20 °/₀₀ = dose liminaire fongostatique

La dose fongicide déterminée dans notre expérience, et qui est par définition la concentration pour laquelle le champignon ne pousse plus (par inhibition de la germination des endospores ensemencées) est ici de 2,40 °/₀₀ de désogène.

2,40 °/₀₀ = dose liminaire fongicide.

# CHAPITRE II

## ACTION SUR MYCODERMA ACETI

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, après le lavage des cuves de vinification avec de l'ammonium quaternaire, un rinçage plus ou moins bien fait risque d'entrainer ces substances dans le vin lui-même, vis-à-vis duquel elles pourraient jouer le rôle de stabilisateur, particulièrement vis-à-vis du mycoderma aceti, agent de l'acétification du vin.

Nous voulons précisément voir si ces ammoniums quaternaires sont efficaces, autrement dit, s'ils ont un pouvoir antifongique contre le mycoderme aceti, et dans ce cas à quelle concentration cette action est-elle perceptible, Pour celà nous avons entrepris de faire le dosage de l'acidité volatile au départ et en fin d'incubation, soit ici quinze jours après la mise en train de l'expérience.

Technique opératoire (27).

Cette technique consiste à faire une distillation. Nous partons d'une prise d'essai de 10 cm3 de vin à titrer, et nous recueillons 100 cm3 de distillat, lequel contient les acides volatils contenus dans cette prise d'essai. Le titrage du distillat se fait par NaOH N/10 en présence de phénol-phtaléine, le nombre n$^{cc}$ de NaOH N/10 versé est multiplié par 0,49, nous obtenons alors l'acidité exprimée en grammes de $SO_4H_2$ par litre de vin.

Principe de l'expérience.

Nous préparons une suspension de mycoderma aceti à partir d'une "mère de vinaigre", nous homogénéisons cette suspension à l'aide de petits agitateurs de verre stériles.

Dans les cuves à expérience nous versons 200 cm3 de vin. La conduite de l'expérience nécessite 6 cuves dont 2 témoins.

Dans chacune de ces cuves, y compris les deux témoins, nous ajoutons 20 cm3 rigoureusement mesurés, de la suspension de cellules de mycoderma aceti, puis nous ajoutons ensuite dans chacune des cuves, excepté les deux témoins, des concentrations croissantes d'ammoniums quaternaires, telles que le titre en ammonium quaternaire atteigne les valeurs suivantes :

— cuve 1 : 0,50 °/₀o ammonium quaternaire
— cuve 2 : 1 °/₀o — „ —
— cuve 3 : 2 °/₀o — „ —
— cuve 4 : 3 °/₀o — „ —

Le titre en acidité volatile du vin au départ était de 0,60 gr. de SO4H2 par litre.

Nous laisserons incuber 15 jours dans les conditions normales soit une température de 15° à 18° C.

Résultats de l'expérience.

Au bout de ces 15 jours d'incubation un titrage d'acidité est opéré dans chacune des cuves.

Ces titrages nous permettent de dire qu'une diminution de l'acidité ne débute que pour les concentrations de 1 °/₀o ; au-dessous de cette concentration le titre en acidité est le même que celui des témoins.

Conclusions de l'expérience.

Nous concluons donc, que *l'action antimycoderma aceti de l'ammonium quaternaire ne se manifeste qu' à partir des concentrations fortes* (1 °/₀o), et il a été montré que pour ces concentrations des perturbations importantes de la fermentation avaient

lieu ; d'où le danger de l'utilisation de ces principes dans un but de stabilisation des vins ( ou dans le cas de concentrations inférieures, l'inefficacité de ces substances, en tant que substances de conservation des vins). (1)

Remarque.

Des expériences mettant en jeu diverses concentrations d'ammoniums quaternaires, faites au préalable, nous ont conduit à la mise en train de l'expérience dont le compte-rendu est mentionné ci-dessus.

(1) On pourrait se poser la question de l'utilisation des hydrates d'$NH^4$ quartenaires appliqués seulement après la fermentation sur le vin, dont ils deviendraient en quelque sorte des stabilisateurs ; nos résultats ne sont pas en faveur de cette manière de procéder car, pour inhiber le Mycoderma aceti il faut des concentrations dépassant $1^0/_{00}$.

# CHAPITRE III

## ESSAIS DE TOXICITE

Utilisés dans un but utile c'est-à-dire de conservation du moût d'abord, du vin ensuite, à l'abri des champignons saprophytes, c'est-à-dire à des doses fongostatiques et fongicides, ces ammoniums quaternaires peuvent-ils provoquer des désordres organiques dans l'espèce animale, c'est ce que nous essayons d'observer en faisant ces essais de toxicité sur des cobayes.

### Technique expérimentale

Ces essais consistent à faire ingérer régulièrement pendant 10 jours à une série de cobayes sains et de poids à peu près égal, du jus de raisin frais contenant une dose fongicide de désogène, soit 2,4 °/₀o.

Ces cobayes sont pesés au départ, régulièrement tous les jours 10 cm3 de jus de raisin contenant l'ammonium quaternaire sont donnés à l'aide d'une pipette; cette prise de 10 cm3 est donnée en 2 fois à quelques heures d'intervalle.

### Résultats de l'expérience.

Nous notons au bout de 5 jours de prises quotidennes :

pour-0,10g. de désogène par Kg de poids un amaigrissement de 2,5 °/₀
pour-0,15g. — „ — — „ — — „ — 5, °/₀
pour-0,20g. — „ — — „ — — „ — 18 °/₀

Nous observons que l'amaigrissement augmente rapidement avec la quantité d'ammonium quaternaire ingérée.

La mort survient pour

- 0,15g. de désogène par Kg. de poids avec amaigrissement de 18 % au bout de 6 jours de prises régulières,
- 0,20g. de désogène par Kg. de poids avec amaigrissement de 20 % au bout de 6 jours de prises régulières.
- 0,25g. de désogène par Kg. de poids avec amaigrissement de 40 % au bout de 9 jours de prises régulières.

Il parait y avoir un désordre dans le métabolisme général, peut être du type avitaminique ; les ammoniums quaternaires étant des bactéricides puissants seraient susceptibles de détruire les bactéries de la flore intestinale ( principale génératrice du complexe vitaminique B jouant un rôle important dans le métabolisme des glucides en particulier ).

# CONCLUSIONS GENERALES

Ayant après chaque chapitre donné les conclusions qui s'y rapportaient, nous serons donc très brefs, en ce qui concerne les conclusions générales.

Notre but était de mettre en évidence, s'il y avait lieu de le faire, l'activité fongicide et fongostatique des composés ammoniums quaternaires dont l'utilisation dans l'industrie alimentaire se précise de plus en plus.

A la lumière de notre étude bibliographique et de ces expériences, nous pouvons conclure que, si les ammoniums quaternaires ont un pouvoir bactéricide très prononcé et classé, le pouvoir fongicide lui, est beaucoup moins précis, beaucoup plus discuté.

De toutes façons, nous pouvons dire que les ammoniums quaternaires ont un pouvoir fongicide, d'ailleurs discuté, que nous avons essayé de déterminer dans le cadre bien spécial des espèces saprophytes (moisissures blanches: mucorinées et moisissures vertes: aspergillacées) mais cette action est précédée d'une action fongostatique tendant à fausser les résultats finaux. Cette action a déjà été observée mais dans le cadre des champignons pathogènes pour l'espèce animale, tel le trichophyton mentagrophytes.

Dans le cadre de la fermentation en général, et en particulier de la fermentation vinaire, nos recherches ont eu pour résultat de démontrer la sensibilité des levures (saccharomyces cerevisiae Hans pour la bière, et S. Ellipsoïdeus, Pastorianus et exiguus pour le vin) à ces ammoniums quaternaires; alors que les moisissures saprophytes couramment développées sur les

moûts nécessitent l'utilisation de fortes doses. Dans ces conditions, on conçoit que, pour atteindre ce second but (conservation des moûts à l'abri des moisissures) nous observons des perturbations et même un blocage complet dans le processus de la fermentation.

Sur ce point cependant, et c'est là vraisemblablement l'originalité de nos conclusions, nous avons expliqué que :

1°/- le pouvoir fongostatique de très faibles applications de désogène était dû à l'action combinée de la fermentation productrice d'alcool et de CO2 et de l'ammonium quaternaire (ce dernier étant sensibilisé dans ses actions toxiques par la présence d'alcool).

2°/ que dès l'instant où la fermentation est plus ou moins inhibée par l'application de concentrations moyennes, l'activité fongostatique et fongicide de l'ammonium quaternaire agissant seule, est insuffisante pour inhiber le développement des moisissures qui pullulent à la surface du moût.

3°/- lorsque la concentration fongicide pour les Aspergillacées est atteinte, il va s'en dire que la fermentation est pratiquement bloquée.

4°/- des expériences faites sur l'action des ammoniums quaternaires sur l'inhibition éventuelle de l'acétification du vin par le mycoderma aceti, il ressort, que cette action freinatrice de l'acétification ne se fait que pour des concentrations en désogène supérieures à celle provoquant des arrêts fermentaires, c'est-à-dire, supérieures aux doses pour lesquelles nous avons observé une sensibilité importante des divers saccharo mytacées intervenant dans le processus fermentaire du vin.

En résumé, dans l'éventualité d'application en oenologie d'hydrates d'ammonium quaternaires, nous inclinons à penser, que ceux-ci ne doivent pas être présents au cours de la fermentation, ou tout au plus à des concentrations ne dépassant pas

0.02 à 0,03 °/₀₀, au delà leur action étant inefficace ou nuisible (soit par pollution fongique soit par arrêt fermentaire).

Le problème de la stérilisation des cuves à l'aide de ce produit, s'il s'inspire de ces notions, doit inciter le viticulteur, après leur application, à rincer rigoureusement les cuves avant d'y introduire le moût.

Enfin, les observations pratiques de certains oenologues ayant confirmé des arrêts de fermentation à la suite d'application des ammoniums quaternaires, nous nous sommes posé la question de savoir dans quelle mesure et à quelle dose ces principes sont toxiques; après quelques essais faits sur des cobayes, nous avons constaté que des prises quotidiennes de jus de raisin frais contenant une concentration fongicide de désogène, pouvaient être la cause d'un amaigrissement assez prononcé. Cet amaigrissement serait-il du type avitaminique ? par exemple, par destruction de la flore bactérienne intestinale que nous savons être la principale productrice des vitamines du complexe B jouant un rôle primordial dans le métabolisme des glucides en particulier.

*Vu et Approuvé*
*Pour le Doyen:*
*L'Assesseur :*

J. DELPHAUT

*Lu, le 3 Février 1955*

PELLISSIER

*Vu et Permis d'Imprimer*
*Aix, le 7 Février 1955*
*Le Recteur*

BLACHE.

# BIBLIOGRAPHIE

1.— ADELSON (L.).- Empoisonnement mortel dû à un détersif cationique du type composé d'$NH^4$ quat. Am. J. Clin. Pathol., 1952, 22, n° 7, 656-61

2.— ALIA (J.).- Emploi des composés d'$NH^4$ quat ,comme desinfectants. Anal. Bromatol. Esp., 1951, 3, n° 2, (51-65).

3.— AUERBACH.- Ind. Eng. Chem. Anal., 15, 1943, 492.
AUERBACH.- Ind. Eng. Chem. Anal., 16, 1944, 799.

4.— BADINAND et GUIRAUD (J.).- Lyon Pharmaceutique n° 5, Mai 1954.

5.— BANFIELD (F. H.) Problèmes soulevés par l'emploi de produits chimiques dans les produits alimentaires. (Leatherhead - Surrey).- Chem. Industr. G. B. 1952, n° 6, 114-8.

6.— BENIGNO (B.) BERTI (T.) (PADOVA). Recherches quantitatives sur le mécanisme d'action antibactérienne des détergents.- Atti. accad. nazion. Lincei. Rendic. Cl. Sci. fis. mat., nat., 1951, 10, n° 1, 67-63.

7.— BENIGNO (B.) BERTI (T.).- Atti. accad, nazion. Lincei. Rendic. Cl. Sci. mat. nat., 1951, 10, n° 1, 57-63. Tabl. Fig.

8.— BENIGNO (B.) BERTI (T.). Recherches sur l'action antibactérienne du CTAB (cetryltumethylammonium.) (Consiglio nazion. Ric.).- Boll. 1st. Sieroterap. Milanese., 1951, 30, n° 1-2, 79-89, graph. Tabl.

9.— BENIGNO (B.) BERTI (T.).- Boll. ist. sieroterap. Milanese., 1951 30, n° 1-2, 90-2 fig.

10 — BENIGNO (B.) (Padova).- Action pharmacologique du cetryltumethylammonium détersif cationique Arch. Ital. Sci. farmacol., 1948, 1, n° 4, 174-5.

11.— BIÖRCK (G.) Ejrup (B.).- Etude expérimentale du Bromure de tétraéthylammonium. Acta. Med. Scand., 1949, 133, n° 5, 299, 320 graph. Tabl.

12.— BUTTERFIELD (C.T.) WATTIE (E.) CHAMBERS (C.W.) Action bactéricide des composés d'$NH^4$ quaternaires. (Cincinnati). Publ. Hlth. Rep. U.S.A., 1950, 65, n° 33, 1039-56, 1 fig. 3 tabl.

13.— BUTTERFIELD (C.T.) WATTIE (E.) CHAMBERS (C.W.) (Hlth. Center Cincinnati Ohio).- Publ. Hlth. Rep. U.S.A., 1950, 65, n° 33, 1039-56, Tabl. Fig.

14.— COLICHMAN.- Ind. Eng. Chem. Anal., 19, 1947, 430.

15.— COLLINS (E.B.) JOHANSSEN (K.R.).- Le rouge congo en tant qu'inhibiteur des composée d'$NH^4$ quaternaire. J. Dairy Sci. U.S.A., 1951. 34, n° 4, 303-9, Tabl.

16.— COPPOCK (J.B.M.).- Problèmes analytiques et pharmacologiqués soulevés par l'utilisation de produits chimiques, organiques, comme auxiliaires de préparation et de désinfection dans l'industrie alimentaire. J. Sci. Food agric., G.B., 1952, 3, n° 3, 115-22, Tabl.

17.— CRUICKSCHANK-SQUIRE (J.R.). La sensibilité cutanée à la cétrimide (CTAB) 6 Brit. J. industr. Med , 1919, 6, n° 3.

18.— CURRANN (H.R.) EVANS (F.R.).- Composés d'$N.H^4$ quaternaires comme agents de stérilisation des spores bactériennes (Washington). J. Dairy. Sci. U.S.A., 1950, 33, n° 1, 1-15, Tabl.

19.— DAMIENS (R.).- Etude dans la série ammonium quaternaire, applications bactériologiques. Ann. Chim. Fr. (Nov.-Déc. 1951), 6, 635, 79.

20.— DUMAZERT (Ch.).- Bull. Soc. Biol., Tome XVII, 1935, p. 1163.

21.— DUNN (C G.).- Fungicidal properties of alkyldimethyl benzyl $NH^4$ chloride. Proc Soc. Exp. Biol. and med., 37 : 661 (1938).

22.— EGGENBERGER (D. N.) HARRIMANN (L. A.) MAC CLORY (M.J.) NOEL (D.) HARWOOD (H.J.) (Chicago).- Recherches sur la conductibilité au cours des mécanismes bactéricides. Ann. New-York. Acad.Sci., 1950-53, n° 1, 105-11 - Graph.

23 — GERSHENFELD (L.) STEDMANN (R.L.) (Philadelphie).- Les effets potentialisateurs de divers composée sur l'activité antibactérienne de corps tensio-actifs. Am. J. Pharm. 1949, 12L, n° 7, 249-67, tabl.

24.— GOTTLIEB (K.R.) - Dansk. Tidss. Farm. 27, 1953, 198.

25.— GROSSI (C.).- Efficacité antibactérienne du bromure de cetryl trimelthyl $NH^4$ Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 1951, 31,n° 1.

26.— HARRIS (G.H.), SHELTON (R.S.), M.G. VAN CAMPEN (E.R.) ANDREWS, SHUMANN (E.L.).- Sels d'$NH^4$ quaternaires dérivés de Pyridines substituées. J. Amér. Chem. Soc., 1951, 73, n° 8, 3959, 63 Tabl.

27.— JAULMES.- Analyse des vins-2me édition, revue librairie Poulain, Montpellier. 1951, page 48.

28.— KEITH (S.F.) GREEN (H.D.) WILLIAMS (S.C.) DAVIS (C.C.) Etude de l'intoxication aigue et chronique par l'ion tétraethyl $NH^4$. Wake-Forest Winston Salem (N C.) - Circulation U.S.A., 1952 6, n° 6, 902-10 Tabl. Fig.

29.— KLARMANN (E.G.) WRIGHT (E.S.) (Bloomfield) (N.J.).- Les Composés d'$NH^4$ quaternaires sont-ils sporicides? Amer. J. Pharm. 1950, 122, n° 9, 330, 6,

30.— KLARMANN (E.G.) WRIGHT (E.S.) - Les Composés d'$NH^4$ quaternaires sont-ils fongicides? Amer. Pharm., 1954, 126, n° 8 Août.

31.— KLARMANN (E G.) WRIGHT (E.S.).- An inquiry into the germicidal performance of quaternary ammonium desinfectants. Comparative methodological studies. Soap and sanit. Chem., 22 (1), 125, 1946. Ibid., 22 (8), 139, 1946.

32.— KLARMANN (E.G.) WRIGHT (E.S.) SHTERNOV (V.A.).- Application of the "Semi-micro" method of the evaluation of antiseptics. Amer. J. Pharm. 122, 5, 1950.

33.— KLARMANN (E.G.) WRIGT (E.S.).- A "semi-micro" method for testing quaternary $NH^4$ desinfectants. Amer. J. Pharm., 120: 146, 1948.

34.— LAMBIN (S.).- Méthode de mesure de l'activité antimicrobienne de substances chimiques. Paris Masson 1933, Gr. in 8 XV 207 p. fig (2150) 4°R, 489 (2269) Série A, 1404, n° 2269.

35.— MAC CULLOCH (E.C.).- The real and the apparent bactericidal efficiency of the quaternary ammonium compounds. J. Bact. 53,: 370 (1947).

36.— MASON (C.T.) BROWN (R.W.) MINGA (A.E.).- Rapports entre l'activité fongicide et la constitution chimique. Phytopathologie U.S.A. 1951, 41 n° 2, 164-71. Tabl.

37.— MEÏS (J.J.).- Essai de classification raisonnée des espèces appartenant au genre penicillium link - Strasbourg imp. des Arts Sussmann, 1949.

38.— PIEN - DESIRANT - ROCHELLE.- Ann. Falsif. et Fraudes, 1951 505.

39.— RAWLINS (A.L)SWEET (L.A.) JOSELYN (D.A.).- Relationship of chemical structure to germicidal activity of a serie of quaternary ammonium salts. J.A.P.A. (Scient. Ed.) 32: 11, 1943.

40.— REDDISH (G. F.) (St Louis).- Tendances actuelles des méthodes d'évaluation des antiseptiques. Ann. New-York Acad. Sci., 1950. 53 n° 1, 149-62.

41.— RESUGGAN (J.C.L.).- Quelques propriétés antibactériennes et autres de composés d'$NH^4$ quaternaires contenant 2 chaînes lipophiles. J. appl. Chem. Suppl. G.B. (1951), 1, n° 2 86-94, Tabl.

42.— SALTSON (M.R.S.).- Propriétés bactéricides de quelques détersifs cationiques. Austral. J. Sci. Res. Ser. B., 1950, 3, n° 1 46-60, courbe, Tabl.

43.— SCHWARTZ (M.) (Copenhague).- Lancet G.B., 1949, 256, n° 6563 1001-2.

44.— SEIDENBERG (J.) Basel.- Essai bactériologigue d'un nouveau désinfectant de la série des composés d'ammonium quaternaire. Schweiz med. w. Schr., 1949, 79 n° 41 978-80, Tabl.

45.— SIJPEBTEIJN (A.K.) VAN DER KECK (G.S.M.) (Utrecht).- Recherches sur les fongicides organiques. Antonie van leeuwenhoek Nederl., 1952, 18 n° 2, 83-106. fig. Tabl. graph.

46.— SMITH (C.R.) NISHIHARA (H.) GOLDEN (F.) HOYT (A.) GUSS (C.O.) KLOETZEL (M.C.) (Los-Angelès).- L'effet bactéricide des agents tensio-actifs sur les bacilles tuberculeux. Publ. Hlth. Rep. U.S.A., 1950 65, n° 48, 1588-600, 3 Tabl.

47.— SOIKE (K.F.) MILLER (D.D.) ELLIKER (P.R.).- Influence du Ph. de la solution de composés d'$NH^4$ quaternaire sur leur activité germicide. J. Dairy Sci. U.S.A. 1952, 35 n° 9, 764-71, courbe.

48.— STANEK (J.) LETOVSKY (V.).- Sur les sels d'$NH^4$ quaternaires bis quaternaires du type zéphyrol. Collect. Trav. Chim. Tschecoslov. 1950, 15, n° 7.,406-11.

49.— STEWART (J.M.).- Propriétés germicides des composés d'$NH^4$ quaternaires. Soap Sanit. Chem. U.S.A. 1950, 26 n° 4, 124-7, Fig.

50.— STUART (L.S.) BOGUSKY (J.) FRIEDL (J.L.).- Soap, Sanit. Chem. U.S.A., 1950, 26 n° 1, 121-5.

51.— URQUHART (W.B.M.).- Solution détersive pour stérilisation pénètrante. J. inst. Brew. G.B., 1951, 57, n° 6, 452-3.

52.— WALKER (G.C.) PORTER (C.L.) DEKAY(H.G.)- Evaluation de l'activité fongicide et fongostatique de certains phénols et agents tensio-actifs. J. Amer. Pharm. Ass. 1952, 41, n° 2, 77-9, Tabl.

53.— ZISSMANN (E.).- Relations entre la structure chimique et les propriétés antiseptiques de quelques sels d'$NH^4$ quaternaires. C.R. acad. Sci. Fr., 1952, 234, n° 7, 759-62, Tabl.

# TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS . . . . . 11
OBJET DU TRAVAIL . . . . . 15
PLAN ADOPTE . . . . . 18

PREMIERE PARTIE . . . . . 19

A/ - CHAPITRE PRELIMINAIRE . . . 20

1°/- Principaux ammoniums quaternaires utilisés. 20

2°/- Propriétés des ammoniums quaternaires . 22

3°/- Activité fongicide des ammoniums quaternaires - ses rapports avec la formule chimique . . . . . 24

4°/- Action pharmacodynamique et toxicité des ammoniums quaternaires . . . 26

5°/- Méthodes d'évaluation de l'activité antiseptique des ammoniums quaternaires . . . . . 26

- Techniques d'évaluation du pouvoir fongicide . . . . . 29

- Techniques chimiques de dosage des ammoniums quaternaires . . . 33

DEUXIEME PARTIE - RECHERCHES PERSONNELLES 35

CHAPITRE 1. : Expériences mettant en oeuvre les levures . . . 36

- Expériences sur moût de bière . . 36
- Expériences sur moût de raisin . . 41

CHAPITRE 2. : Action sur mycoderma aceti . 61

CHAPITRE 3. : Essais de toxicité . . . 64

CONCLUSIONS . . . . . 66

BIBLIOGRAPHIE. . . . . 69

Imprimerie RIFFIS & Co. Port-Said.